

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Зарудна Маргарита Іванівна



УДК 577.21

**СТРУКТУРНІ ПЕРЕХОДИ В ГОМОПОЛІРИБОНУКЛЕОТИДАХ
ТА ЇХНЄ БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ**

03.00.03 – молекулярна біологія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

КИЇВ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Говорун Дмитро Миколайович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
заступник директора інституту з наукової роботи,
завідувач відділу молекулярної та квантової біофізики.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ "Інститут біології", Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, м. Київ,
професор кафедри загальної та молекулярної генетики;

доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України,
Стойка Ростислав Степанович,
Інститут біології клітини НАН України, м. Львів,
завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу;

доктор медичних наук, професор,
Досенко Віктор Євгенович,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ,
провідний науковий співробітник, завідувач відділу загальної
та молекулярної патофізіології.

Захист дисертації відбудеться 29 вересня 2015 року о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано серпня 2015 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
к.б.н., с.н.с.

І. В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вторинна та структури вищих рівнів про-мРНК і мРНК відіграють значну роль у їхньому функціонуванні (Jacobs et al., 2012; Mortimer et al., 2014), проте дослідження їхніх структурних особливостей, на відміну від транспортних, рибосомних та низки малих РНК, знаходиться нині на початковому етапі. Структуру про-мРНК і мРНК не можна достеменно охарактеризувати, не враховуючи присутніх у них трактів гомополіонуклеотидів і гомоолігонуклеотидів, які мають унікальні структурні особливості (Зенгер, 1987) і дають особливий внесок у загальну архітектуру цих біополімерів.

Гомополімерні тракти виконують функції регуляторних елементів у багатьох важливих процесах життєвого циклу про-мРНК/мРНК. У клітині містяться численні білки, які специфічно зв'язуються з гомополімерами. Так, наприклад, широко поширені білки PABPCs (cytoplasmic poly(A)-binding proteins) (Eliseeva et al., 2013), які зв'язуються із полі(А), білки α CPs (α -complex proteins) (Makeyev & Liebhaber, 2002), що взаємодіють з оліго(С)-трактами, білок HuR, котрий специфічно зв'язується з довгими полі(А)-послідовностями (Ma et al., 1997) та білок гЯРПН Н, що взаємодіє як з короткими оліго(Г)-трактами (Caputi & Zahler, 2001), так і з G-квадруплексами (Decorsière et al., 2011) та ін. Однак молекулярні механізми багатьох процесів, що відбуваються за участю гомополімерних трактів, виявлені не повністю або ж взагалі невідомі. Так, зокрема, недостатньо вивчено механізми специфічної стабілізації полі(А)-хвостів мРНК еукаріотів різними білковими комплексами (Brook & Gray, 2012), термінації поліаденілування про-мРНК (Eckmann et al., 2011), саморегуляції синтезу PABPC (Patel & Bag, 2006) та інших біологічних процесів.

При дослідженні взаємодії клітинних білків з полі(А), полі(С) і полі(U) структурне різноманіття гомополімерів, зазвичай, не враховують. Так, наприклад, не беруть до уваги, що одноланцюговий полі(А) існує щонайменше у двох різних конформаціях (Porschke, 1973, 1978; Dewey & Turner, 1979; Kononov & Bukina, 2002), що для одноланцюгової спіралі полі(С) в літературі запропоновано дві різні моделі (Arnott et al., 1976; Broido & Kearns, 1982), а низка уридинових залишків набуває унікальної конформації (Broyde & Hingerty, 1980). Більше того, не враховується, що ці гомополімери і олігомери, структурні характеристики яких багато в чому подібні, можуть утворювати структури вищих порядків. Незважаючи на те, що такі структури в полі(А) та полі(С) індукуються протонуванням основ при слабкокислих рН, вони можуть утворюватися і в клітині перенесенням протонів від кислих амінокислотних груп білків на цитозинові або аденінові основи (Hellendoorn et al., 1996; Samijlenko et al., 1998).

Крім того, гомополірибонуклеотиди використовують у молекулярній біології як інструменти для первинного виявлення специфічності РНК-зв'язувальних білків, якщо точна послідовність місця зв'язування невідома (наприклад Denman, 2003). Окремі гомополірибонуклеотиди нині розглядають як потенційні терапевтичні агенти або мішені (Adepoju & Geiger, 2010; Giri & Kumar, 2010; Ji et al., 2011), а також обговорюються перспективи їхнього застосування у РНК-нанотехнологіях

(Zhao et al., 2008), зокрема при конструюванні сучасних біомолекулярних пристроїв, функціонування яких базується на структурних переходах.

Незважаючи на інтенсивне дослідження структурних особливостей полі(А), полі(С), полі(Г) і полі(У) протягом декількох десятків років, залишилося чимало спірних і нез'ясованих питань. Так, зокрема, невідомо, яку просторову будову має дволанцюгова форма полі(А), основи якої не утворюють водневих (Н) зв'язків з фосфатами (Finch & Klug, 1969; Adler et al., 1969, Janik et al., 1972; Lerner & Kearns, 1981), чи здатний полі(С) формувати і-мотив (Guéron & Leroy, 2000). Немає єдиної думки про те, за яких концентрацій моновалентних катіонів відбувається структурний перехід полі(Г) з одностанцюгової спіралі у квадруплекс (Souleil & Ranijel, 1968; Rice et al., 1973, Лесник и соавт., 1980 і посилання в цих роботах) тощо. Таким чином, поглиблене, комплексне дослідження фізико-хімічних властивостей гомополімерів за допомогою нових методів і підходів для достеменного розуміння механізмів важливих біологічних процесів, що протікають за участю клітинних білків, які специфічно взаємодіють з цими макромолекулами, є нині нагальною і актуальною задачею.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному планові наукових досліджень відділу молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Її виконано в рамках бюджетних тем «Вивчення специфічності білково-нуклеїнових взаємодій в модельних системах різного рівня складності» (№ держ. реєстрації 01.91.0002584, 1991-1995 р.р.); «Вивчення фізико-хімічної природи перебігу елементарних процесів білково-нуклеїнового впізнавання в модельних системах типу «мономер-мономер» та «мономер-полімер» (№ держ. реєстрації 0198U005247, 1996-2000 р.р.); «Дослідження глибинних фізико-хімічних механізмів елементарних процесів білково-нуклеїнового впізнавання» (№ держ. реєстрації 0101U000603, 2001-2005 р.р.); цільових програм ВБФМБ НАН України: "Молекулярні основи функціонування геному та його регуляція" ("Фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні основи функціонування живих систем і розробка принципів керування ними", № держ. реєстрації 0104U000436, 2002-2006 р.р.); «Вивчення фундаментальних основ організації і експресії генів і структурно-функціональні дослідження протеомів організмів в нормі та за умов патологій; розробка основ новітніх біотехнологій для діагностики і лікування важких патологій». ("Фундаментальні основи геноміки та протеоміки", № держ. реєстрації 0107U000337, 2007-2011 р.р.); «Структурна та функціональна геноміка для вивчення ряду проблем функціонування вірусів, бактерій та вищих еукаріот» («Функціональна геноміка, протеоміка і метаболоміка в системній біології», № держ. реєстрації 0112U002108, 2012-2016 р.р.), а також отриманих на конкурсних засадах низки вітчизняних та міжнародних проектів, а саме – гранту міжнародного наукового фонду "Україна", шифр K1F100, 1994-1995 р.р.; «Створення біоінформаційного ресурсу для діагностики СНІДУ (база даних вторинних структур контрольних елементів геному ВІЛ-1)» (програма Державного фонду фундаментальних досліджень України «Фундаментальні основи новітніх генних та клітинних технологій», договір 18/037, 2006-2007 р.р.); «Філогенетичне дослідження

структурних варіантів сигнальних елементів, розташованих в 5' UTR геному ВІЛ-1» (Програма «Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини» договір № 10, 2007-2010 р.р.); «Роль вторинної структури РНК в реплікації ВІЛ-1: дослідження молекулярно-генетичними, філогенетичними та біоінформаційними методами» (проект УНТЦ, договір № 4302, 2008-2010 р.р.). Частину дисертації (1983-1984 р.р.) виконано в лабораторії фізики біополімерів Інституту молекулярної генетики АН СРСР (м. Москва, Росія).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – експериментально вивчити фізико-хімічні характеристики гомополірибонуклеотидів, їхню взаємодію з похідними амінокислот і структурні переходи у залежності від умов середовища за допомогою нових фізико-хімічних методів, а також розробити та обґрунтувати на основі цих даних молекулярні моделі біологічних процесів, які можуть реалізуватися за участю самоасоціатів гомополімерів.

Для досягнення мети сформульовано наступні взаємопов'язані завдання:

1. Дослідити на прикладі ДНК вплив іонної сили розчину на ефективні розміри полінуклеотидів методом осмометрії.
2. Вивчити структурні переходи у полі(А), полі(С), полі(Г) і полі(У) та взаємодію останніх з похідними основних амінокислот методом аналітичного електрофорезу у залежності від умов середовища.
3. Вивчити структурні переходи у полі(А) і полі(С) методом протонної буферної ємності та їхню залежність від умов середовища.
4. Розробити та обґрунтувати молекулярні моделі біологічних процесів, які можуть відбуватися за участю самоасоціатів гомополірибонуклеотидів.
5. Створити базу комплексних сигналів поліаденілування про-мРНК людини та проаналізувати зустрічальність різних допоміжних сигнальних елементів полі(А)-сайтів, а також послідовностей, які здатні утворювати чотириохланцюгові структури.

Об'єкт дослідження: природа структурних переходів у гомополімерах в залежності від умов середовища; молекулярні механізми функціонування трактів гомополі(оліго)рибонуклеотидів у природних РНК.

Предмет дослідження: структурні переходи у синтетичних гомополірибонуклеотидах полі(А), полі(С), полі(Г) і полі(У) та моделі функціонування.

Методи дослідження: для дослідження об'ємних ефектів у полінуклеотидах на прикладі ДНК використано метод осмометрії, структурні переходи у гомополірибонуклеотидах вивчено методами спектроскопії електронного поглинання, аналітичного електрофорезу та протонної буферної ємності. При створенні моделей сайтів поліаденілування вірусних про-мРНК комп'ютерне передбачення вторинної структури РНК здійснювали за допомогою програм «mfold» і «UNAFold».

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше визначено ефективний діаметр подвійної спіралі ДНК у широкому інтервалі іонних сил (0,01-0,1М). Для вивчення структурних характеристик гомополірибонуклеотидів у залежності від

умов середовища вперше застосовано методи аналітичного електрофорезу і протонної буферної ємності. З їхнім використанням отримано нові дані про фізико-хімічну природу структурних переходів у полі(A), полі(C) і полі(G). Вперше запропоновано структурні механізми утворення двох різних одноланцюгових і двох різних дволанцюгових форм полі(A), «замороженої» форми полі(A) та чотирьохланцюгової структури полі(C). Розроблено та обґрунтовано молекулярні моделі залучення самоасоціатів полі(A) і полі(G) до низки важливих біологічних процесів.

Практичне значення одержаних результатів. Оскільки гомополірибонуклеотиди розглядають як потенційні терапевтичні агенти або мішені, а також як претенденти на застосування в РНК-нанотехнологіях, важливо мати детальну інформацію про структурні характеристики цих полімерів при створенні лікарських препаратів і конструюванні відповідних біомолекулярних нанопристроїв. Нові дані, отримані у дисертації, можуть бути корисними у цих галузях знань. Проведене в роботі широкомасштабне філогенетичне дослідження структурних елементів сайту поліаденілування про-мРНК ВІЛ-1 може виявитися корисним при конструюванні терапевтичних антиретровірусних агентів, спрямованих на пригнічення функції сигнальних елементів, суттєвих для реплікації вірусу.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок дисертанта є визначальним на всіх етапах дослідження. Головні ідеї, розроблені в дисертації, належать автору. У більшості робіт, опублікованих спільно із співавторами, особистий внесок здобувача полягає у виконанні значного обсягу експериментальної частини та безпосередній участі в аналізі та інтерпретації отриманих результатів. Автор висловлює глибоку подяку всім своїм співавторам публікацій за співпрацю, насамперед, к.б.н., с.н.с. А. Л. Потягайлу та к.б.н., с.н.с. І. М. Коломієць за внесок у роботу зі створення бази полі(A)-сайтів людини, а також н.с. Степанюгіну А. В. за участь у проведенні досліджень гомополімерів методом електрофорезу. Особливу повагу і вдячність автор висловлює науковому консультанту – члену-кореспонденту НАН України, професору Д. М. Говоруну за увагу до роботи, плідні дискусії та моральну підтримку.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідалися на таких фахових наукових форумах: Симпозіумі за участю країн-членів РЕВ і СФРЮ «Фізико-хімічні властивості біополімерів в розчині і клітинах» (Пушино, СРСР, 1985); I-з'їзд Українського біофізичного товариства (Київ, Україна, 1994); II з'їзд Українського біофізичного товариства (Харків, Україна, 1998); Конференція з фізики біологічних систем (за участі міжнародних учасників, Пуща-Водиця (Київ), Україна, 1998); XIV міжнародна школа-семінар «Спектроскопія молекул та кристалів» (Одеса, Україна, 1999); II з'їзд біофізиків Росії (Москва, Росія, 1999); XIV міжнародний круглий стіл «Нуклеозиди, нуклеотиди та їх біологічне застосування» (Сан-Франциско, США, 2000); VIII Український біохімічний з'їзд (Чернівці, Україна, 2002); Установчий з'їзд українського товариства клітинної біології (Львів, Україна, 2004); I Українська наукова конференція «Проблеми біологічної і медичної фізики» (Харків, Україна, 2004); IV міжнародна конференція

«Біоресурси и віруси» (Київ, Україна, 2004); 5-а Всеросійська науково-практична конференція «Генодіагностика інфекційних хвороб» (Москва, Росія, 2004); IV з'їзд Українського біофізичного товариства (Донецьк, Україна, 2006); 5-а європейська конференція з клінічних і соціологічних досліджень по СНІДу і лікарським препаратам (Вільнюс, Литва, 2009); 34 конгрес FEBS (Прага, Чеська Республіка, 2009); X Український біохімічний з'їзд (Одеса, Україна, 2010); 7-а щорічна наукова зустріч «Мости в науках про життя» (Будапешт, Угорщина, 2012); XI Український біохімічний конгрес (Київ, Україна, 2014), а також на наукових семінарах та наукових конференціях ІМБіГ НАН України і відділу молекулярної та квантової біофізики.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 49 наукових праць, із них – 1 розділ у міжнародній науковій монографії, 29 статей у вітчизняних та міжнародних фахових виданнях та 19 тез доповідей у збірниках міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, двох експериментальних розділів з обговоренням, розділу, присвяченого молекулярним моделям, розділу, присвяченого створенню бази полі(А)-сайтів про-мРНК людини, заключення, висновків та переліку використаних літературних джерел, який налічує 355 найменувань. Роботу викладено на 312 сторінках машинописного тексту, вона містить 96 рисунків і 16 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали і методи дослідження. В експериментах із визначення ефективного діаметра ДНК використовували ДНК плазміди Col E1 з молекулярною вагою $M = 4,35 \cdot 10^6$, виділену за методом (Clewel, 1972) і люб'язно надану Ю. Любченком. Для отримання відкритої кільцевої форми ДНК обробляли панкреатичною ДНКазою I (фірми Sigma, США) за методом (Liu et al., 1980). Лінійну ДНК отримували із відкритої кільцевої обробкою рестриктазою EcoR1, люб'язно наданою С. Козьявкіним і виділеної за методом (Sümege et al., 1977).

Для вимірювання осмотичного тиску розчинів ДНК нами сконструйовано та виготовлено оригінальний осмометр з вимірювальною коміркою малого об'єму (0,7 мл) та мембраною, високопроникною для розчинника і малопроникною для ДНК. Як мембрани використано ядерні лавсанові фільтри, виготовлені в лабораторії Г. Н. Флєрова в Об'єднаному інституті ядерних досліджень (м. Дубна, Росія) і люб'язно надані Б. Мчедлішвілі.

Електрофоретичні і потенціометричні вимірювання проводили з синтетичними полірибонуклеотидами полі(А), полі(С), полі(U) і полі(Г) фірм «Calbiochem» (США), «Reanal» (Угорщина) і «Serva» (ФРН). Для запобігання утворення «замороженої» форми розчини полі(А) готували при рН $\sim 7,5$, потім доводили рН до необхідного значення кислим буфером (рН 4,5) і після 10-хвилинного прогріву за 75-80 °С на водяній бані розчин витримували 1 год. за кімнатної температури. Використовували гідрохлориди ефірів амінокислот фірм

«Fluka» (Швейцарія) і «Serva» (ФРН), агарозу фірм «BioRad» (США), «Serva» (ФРН) і «Sigma» (США), барвник толуїдиновий блакитний О фірми «Serva» (ФРН).

Електрофорез проводили в агарозних гелях за кімнатної температури у трубках діаметром 0,6 см у електрофоретичній камері «ОЕ-110» (Угорщина) при напрузі ~ 60 В протягом 80-110 хв. Гелі фарбували протягом однієї години 0,01%-им розчином толуїдинового блакитного О (ТБ) за рН 7,4-7,8. Пофарбовані і відмиті від барвника гелі сканували на приладі «Chromoscan-200» (Англія). Електронні спектри поглинання у діапазоні довжин хвиль 400-750 нм у різних ділянках зони пофарбованого полінуклеотида реєстрували на спектрофотометрі "Shimadzu" (Японія), при цьому контролем слугував спектр ділянки гелю, що не містив полінуклеотид. Електрофоретичну рухливість молекул u визначали за формулою $u = (d/t)/(E/l)$ [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] (Остерман, 1981), де d – відстань, пройдена молекулою, t – тривалість електрофорезу, E – різниця потенціалів на кінцях робочого каналу, l – довжина каналу. Поряд з цією характеристикою у роботі використано також відносну електрофоретичну рухливість $R = u_p/u_b = d_p/d_b$, яку розраховували як відношення відстані, пройденої максимумом зони полімеру (d_p), до відстані, пройденої максимумом зони лідируючого барвника бромфенолового синього (d_b). Символи p і b відносяться до полімеру і бромфенолового синього відповідно.

Потенціометричне титрування проводили на рН-метрі «рН-121» за кімнатної температури. Буферну ємність β визначали як $\Delta b/\Delta \text{pH}$, де Δb – зміна концентрації титранту при додаванні його малої порції, а ΔpH – мала зміна рН реакційного середовища, спричинена Δb . При цьому використовували інтервали $\Delta \text{pH} = 0,01$ на ділянках з високою буферною ємністю і $\Delta \text{pH} \leq 0,1$ на інших ділянках.

Послідовності сигнальних елементів геномної РНК ВІЛ-1 вибирали з GenBank (США). Для передбачення вторинної структури цих елементів використовували програми «mfold» (Zuker, 2003) і «UNAFold» (Markham & Zuker, 2008). Згортання проводили автоматично з використанням оригінальної програми, створеної к.б.н., с.н.с. А. Потягайлом. Передбачені структури зберігаються у створеній за ініціативи та участі дисертанта базі даних CESSHIV-1 (Control Elements Secondary Structures of HIV-1 (genome)), доступній на сайті <http://www.cesshiv1.org>.

Результати досліджень та їхнє обговорення.

Вплив іонної сили розчину на ефективні розміри полінуклеотидів.

Нуклеїнові кислоти, в тому числі гомополірибонуклеотиди, дослідженню структурних характеристик яких присвячено дисертаційну роботу, – це сильно заряджені поліелектроліти. Електростатичні ефекти, що залежать від іонних умов у розчині, багато в чому визначають стабільність полінуклеотидів, їхню структуру, реактивність і здатність зв'язувати різні ліганди (Sharp & Honig, 1995). Тому для детального дослідження властивостей гомополімерів експерименти проводили у широкому інтервалі іонних сил I – від 3 до 70 мМ. Зокрема, деякі форми вдалося зареєструвати лише за низьких I , коли набувають великого значення об'ємні ефекти. Для того, аби мати достовірні уявлення про те, якою мірою розміри гомополімерів залежать від іонної сили, що особливо важливо при їхньому дослідженні гідродинамічними методами, такими, насамперед, як електрофорез, об'ємні

(електростатичні) ефекти полінуклеотидів були прискіпливо вивчені на прикладі ДНК методом осмометрії. ДНК обрано для цього не випадково – за своєю архітектурою гомополімери, як лінійні структури, ближчі до ДНК, аніж до довгих природних РНК – розгалужених структур, які складаються із нерегулярних дуплексів і шпильок та лінкерів.

Для опису глобальних конформаційних властивостей ДНК у розчині використано модель полімерного ланцюга, утвореного непроникними незарядженими сегментами з ефективним діаметром (d_{ef}), який враховує як геометричні розміри молекули, так і електростатичну взаємодію між сегментами. При цьому ефективний діаметр визначається як діаметр сегмента довжини l , що має той же виключений об'єм, тобто об'єм, з якого цей сегмент витісняє усі інші, що й реальний сегмент макромолекули (Stigter, 1977). Для його визначення обрано експериментальні умови, за яких (Бирштейн, 1982) осмотичний тиск P визначається як $P/RT = (1/M)c + A_2c^2$, де M – молекулярна маса ДНК, A_2 – другий віріальний коефіцієнт і c – концентрація ДНК. Значення A_2 отримували з величини нахилу прямих концентраційної залежності висоти осмотичного стовпа Δh у координатах $(\Delta h/c, c)$. Величину ефективного діаметра ДНК обчислювали за формулою $d_{ef} = 4(M_s/l)^2 A_2 / P N_A$ (Onsager, 1949), де M_s – молекулярна маса статистичного сегмента Куна, l – довжина Кунівського сегмента, N_A – число Авогадро, а M_s/l дорівнює 195 г/моль Å.

До 1985 р. експериментальні дані про величину d_{ef} в області проміжних іонних сил були відсутні. Нами вперше експериментально виміряно осмотичний тиск розчинів лінійної та кільцевої ДНК і розраховано значення A_2 та d_{ef} у цій області. На рис. 1 а і б представлено залежність висоти осмотичного стовпа Δh від іонної сили розчину I для лінійної та кільцевої форми ДНК за декількох концентрацій останньої.

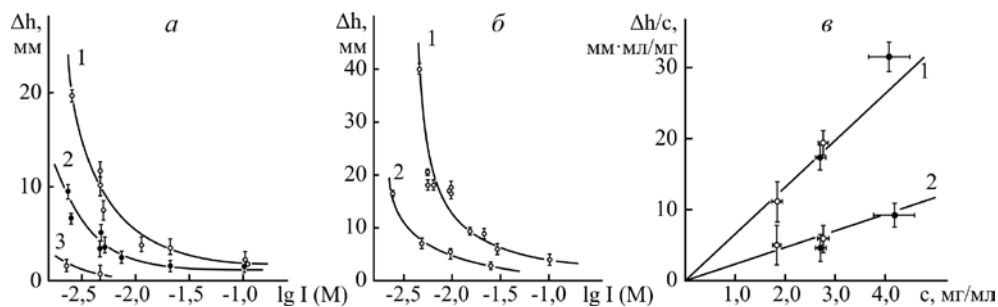


Рис. 1. Залежність Δh водного розчину лінійної ДНК від іонної сили I за різних концентрацій ДНК c (а). 1 – $c = 2,75 \pm 0,1$ мг/мл, 2 – $c = 1,85 \pm 0,1$ мг/мл, 3 – $c = 1,00 \pm 0,05$ мг/мл. Залежність Δh розчину кільцевої ДНК від I (б). 1 – $c = 4,1 \pm 0,4$ мг/мл, 2 – $c = 2,7 \pm 0,1$ мг/мл. Залежність Δh від концентрації ДНК c в координатах $(\Delta h/c, c)$ при $I = 0,01$ (1) і $0,1$ М (2) (в); \circ – лінійна ДНК, \bullet – кільцева ДНК

Видно, що при зменшенні I спостерігається різке збільшення осмотичного тиску, зумовлене електростатичними взаємодіями. Експерименти показали, що в межах похибок вимірювань значення осмотичного тиску для кільцевої та лінійної ДНК збігаються. На рис. 1 в зображено концентраційну залежність висоти

осмотичного стовпа Δh розчину ДНК у координатах ($\Delta h/c$, c) при $I = 0,01$ і $0,1$ М. Залежність виявляється лінійною за іонних сил розчину вище $0,01$ М. За нижчої іонної сили, імовірно, чималий внесок у осмотичний тиск дають взаємодії сегментів вищих порядків, тоді як за більших іонних сил він визначається парними взаємодіями. З нахилу прямих за різних іонних сил розчину обчислено значення A_2 та d_{ef} . Значення d_{ef} ДНК за різних концентрацій NaCl, показано на рис. 2, адаптованому з (Vologodskii & Cozzarelli, 1995), на якому зібрано результати, отримані в різних роботах, включаючи нашу: між усіма величинами спостерігається задовільна відповідність.

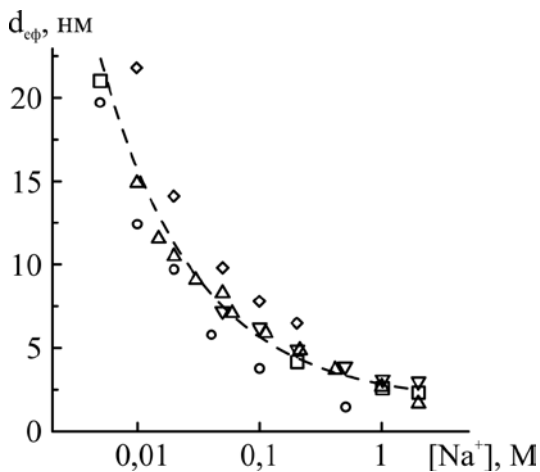


Рис. 2. Ефективний діаметр ДНК d_{ef} як функція концентрації NaCl у водному розчині. \diamond – вимірювання осмотичного тиску (наші дані), \square – вивчення рівноважного розподілу фрагментів ДНК в ультрацентрифузі (Brian et al, 1981), \triangle , ∇ – дослідження ймовірності утворення вузлів за випадкової циклізації ланцюга ДНК (Rybenkov et al., 1993; Shaw & Wang, 1993), \circ – вимірювання світлорозсіяння фрагментів ДНК (Nicolai & Mandel, 1989). Пунктирна лінія відповідає теоретичним розрахункам на основі теорії поліелектролітів (Stigter, 1977)

Іншою найважливішою характеристикою, що визначає ефективний виключений об'єм полімерного сегмента, є персистентна довжина, яка характеризує жорсткість полінуклеотидного ланцюга. Наші дослідження показали, що при зменшенні I в інтервалі $0,01$ - $0,10$ М ефективний діаметр ДНК збільшується приблизно в 2,8 рази, а персистентна довжина (Manning, 2006) змінюється всього в 1,2 рази, тобто основний внесок у зміну об'ємних характеристик полінуклеотидів у цьому інтервалі I вносить саме зміна величини d_{ef} .

Дослідження структурних переходів у гомополімерах методами електрофорезу і протонної буферної ємності.

Залежність електрофоретичної рухливості гомополірибонуклеотидів від умов середовища. Нами вперше досліджено синтетичні гомополірибонуклеотиди методом електрофорезу в агарозних гелях. Електрофоретична рухливість молекул у вільному розчині u_0 прямо пропорційна відношенню їхнього сумарного заряду до коефіцієнту тертя. Між логарифмом u і концентрацією гелю T має місце лінійне співвідношення (Rodbard & Chrambach, 1970): $\ln u = \ln u_0 - K_R T$, де K_R – коефіцієнт затримки, пропорційний ефективному розміру макромолекули, що залежить від маси і форми мігруючої частинки, T – концентрація гелю. Співвідношення для R має вигляд: $\ln R = \ln R_0 - K'_R T$, де K'_R – різниця коефіцієнтів затримки для полінуклеотиду і бромфенолового синього. На рис. 3 (світлі кола) показано графіки

Фергюсона (Rodbard & Chrambach, 1970) (залежності $\ln R$ (або $\ln u$) від T) для різних гомополірибонуклеотидів – полі(G), полі(A) та полі(U) – за $I = 21$ мМ.

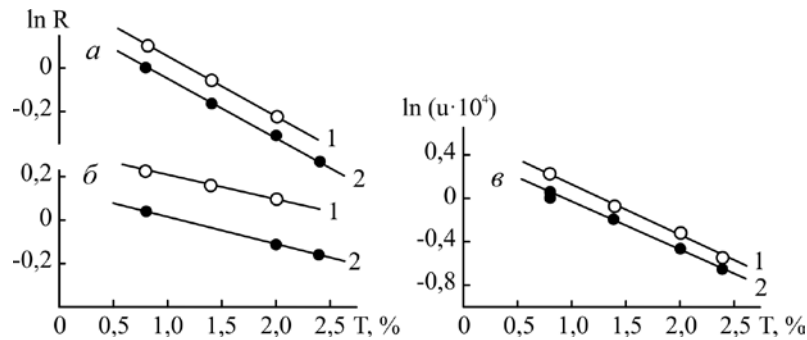


Рис. 3. Графіки Фергюсона для полірибонуклеотидів за відсутності (1) і присутності (2) етилового ефіру лізину. $I = 21$ мМ; рН 7,4-7,8; a – полі(A)_C, b – полі(G)_R; c – полі(U)_S. Тут і далі нижні символи C, S і R відносяться до назв фірм «Calbiochem», «Serva» і «Reanal» відповідно

На рис. 4 показано залежності коефіцієнтів затримки K_R від іонної сили для полі(A) та полі(G). Вони узгоджуються з залежностями ефективного діаметру і персистентної довжини ДНК від іонної сили розчину. При цьому всі три полінуклеотиди знаходяться у різних структурних станах: ДНК – у двохспіральній формі, полі(A) – у вигляді одноланцюгових спіралей і невпорядкованих областей, а полі(G), як буде показано нижче, існує як чотирьохланцюгова спіраль.

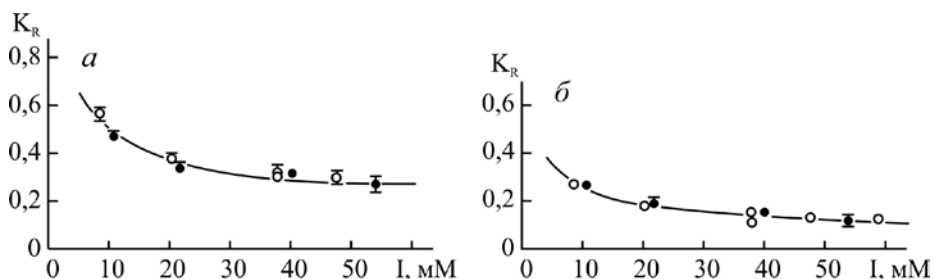


Рис. 4. Залежність коефіцієнтів затримки полірибонуклеотидів K_R від іонної сили I за відсутності (○) і присутності (●) етилового ефіру лізину; рН 7,4-7,8; a – полі(A)_C, b – полі(G)_R

Одним із завдань дисертаційної роботи було дослідження методом електрофорезу взаємодії похідних амінокислот з гомополімерами у зв'язку з проблемою білково-нуклеїнового впізнавання. Чутливість цього методу виявилася достатньою тільки для реєстрації взаємодії гомополімерів з похідними заряджених амінокислот – ефірами лізину і аргиніну. Слід зазначити, що іонну силу розчину змінювали, варіюючи як концентрацію буфера трис-НСІ, так і концентрацію NaCl, проте в межах похибки експерименту співвідношення концентрацій катіонів трис і натрію в буфері не впливало на величину R . З іншого боку, коли у буфер для електрофорезу вводили дигідрохлорид етилового ефіру лізину, спостерігалася помітне зменшення електрофоретичної рухливості гомополімерів (рис. 3, темні

кола), при цьому коефіцієнти затримки у межах похибки вимірювання не відрізнялися (рис. 4). Рухливість за однакових умов експерименту зменшується у послідовності: полі(G) > полі(A) ≥ полі(C) > полі(U). Подібний ефект демонструє також ефір аргініну. Ці результати свідчать на користь того, що методом електрофорезу надійно реєструється взаємодія похідних заряджених амінокислот з гомополірибонуклеотидами і ця взаємодія найсильніша для полі(G). Наші результати знаходяться у відповідності з літературними даними, отриманими іншими методами (Брусков, Бушуев, 1975; Porschke, 1979).

Взаємодію ефіру лізину з гомополімерами було також досліджено при слабкокислих рН, коли обидві аміногрупи практично повністю іонізовані (рис. 5). Як видно на рис. 5, залежність при рН 7,6 за присутності ~ 4 мМ ефіру лізину (пунктирна лінія) близька до залежності, отриманої при рН 5,5 за присутності всього лише 1 мМ ефіру лізину (крива 2). За присутності 4 мМ ліганду (крива 3) електрофоретична рухливість полі(G) зменшується при рН 5,5 значно більше, ніж за рН 7,6. При збільшенні рН, тобто при зменшенні частки дикатіону ефіру лізину в його суміші з монокатіоном, відношення рухливості полірибонуклеотидів за присутності 4 мМ ефіру лізину до рухливості за відсутності ліганду наближаються до одиниці. Цей результат свідчить про те, що зміна рухливості полірибонуклеотидів за присутності ефіру лізину обумовлена не обома формами похідного лізину, а практично лише однією його формою – дикатіоном. В умовах наших експериментів не викликає змін електрофоретичної рухливості за постійної іонної сили і монокатіон похідного іншої амінокислоти – ефіру метіоніну (рис. 5, темні кружки на кривій 1).

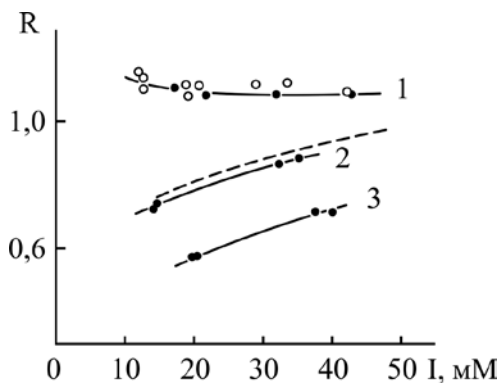


Рис. 5. Залежність відносної електрофоретичної рухливості полі(G)_s від іонної сили за відсутності (○) і за присутності ефірів амінокислот (●) при рН 5,5. Умови: 2,0 %-ва агароза; 1 – 5 мМ ефір метіоніну; 2 – 1 мМ ефір лізину; 3 – 4 мМ ефір лізину; пунктирна лінія – 3,8 мМ ефір лізину, рН 7,6

На рис. 6 представлено залежності коефіцієнтів затримки гомополірибонуклеотидів від іонної сили за відсутності і присутності ефіру лізину при рН 5,5. При кислих рН значення K_R у межах помилки вимірювання не змінюються. Близькість значень K_R за присутності і відсутності дикатіонов похідних амінокислот свідчить про те, що в умовах наших експериментів ефективні розміри гомополімерів залежать від іонної сили розчинника, але не від його складу, при цьому рухливість залежить також і від величини заряду катіонів, що екранують негативно заряджені фосфатні групи. Виняток становить полі(U) за великих концентрацій лізину і низьких іонних сил (рис. 6 б). Значення K_R за цих умов нижчі, ніж у контрольних експериментах, тобто форма полі(U) у цьому випадку компактніша. Слід зазначити, що поліуридилова кислота утворює самоасоціати

лише за температур нижчих за кімнатну за високої концентрації солі (1 М) (Thrierr et al., 1971).

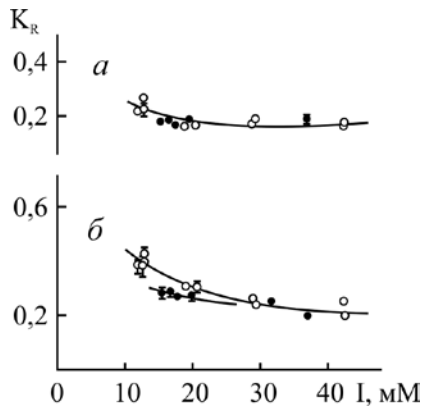


Рис. 6. Залежності коефіцієнтів затримки гомополірибонуклеотидів від іонної сили за відсутності (○) і за присутності 2-4 мМ ефіру лізину (●) при рН 5,5; *a* – полі(G)_S, *б* – полі(U)_C

Вторинна структура може підтримуватися і при вищих температурах за присутності сперміну (Szer, 1966) або полілізину (Carroll, 1972). Вважають, що при утворенні самоасоціату спочатку відбувається утворення багатьох коротких шпильок, а потім їхнє кооперативне перетворення у одну велику шпильку (рис. 7 *a*).

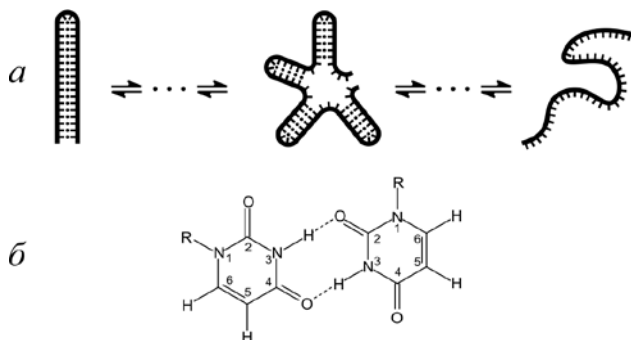


Рис. 7. Структурні переходи в полі(U) (*a*); адаптовано з Thrierr et al., 1971. Схема утворення пар основ у подвійній спіралі полі(U) (*б*) (Young & Kallenbach, 1978). Тут і нижче R – цукрово-фосфатний залишок

Ймовірно, що саме цей ефект – утворення коротких шпильок – спостерігається у наших експериментах за великих концентрацій дикатіону ефіру лізину. У білку ефір лізину може відповідати двом розташованим поруч залишкам цієї амінокислоти.

Структурні переходи в полі(A). Електрофоретичне дослідження двохспіральних форм полі(A). На рис. 8 показано денситограми полі(A) за різних значень рН. Як видно з рис. 8, при переході від нейтральних до кислих рН змінюється не тільки форма електрофоретичної зони полі(A), але й відбувається її роздвоєння, причому швидше мігруюча зона з'являється при підкисленні поступово, вже після того, як сталася різка зміна форми зони в області рН 6,5. Зіставлення з літературними даними (Adler et al., 1969; Finch & Klug, 1969; Janik et al., 1972) дозволяє ідентифікувати зони таким чином. Широка дзвіноподібна зона при рН 7,3 відповідає нейтральному полі(A), що має клубкоподібну форму. Зміну форми зон при рН ~ 6,5 ми пов'язуємо з переходом одноланцюгового полі(A) у двохспіральні форми, які представляють собою стрижнеподібні структури, які гірше поділяються за розміром, аніж клубкоподібні молекули: це призводить до звуження зон. Полі(A) утворює дві різні дволанцюгові форми, які ми назвали *DS* (double stranded) і *DS_p*.

Індекс Р відноситься до дуплекса, в якому основи утворюють Н-зв'язки не тільки між собою, але й з фосфатами (рис. 9). У формі *DS* такі зв'язки відсутні (Lerner & Kearns, 1981).

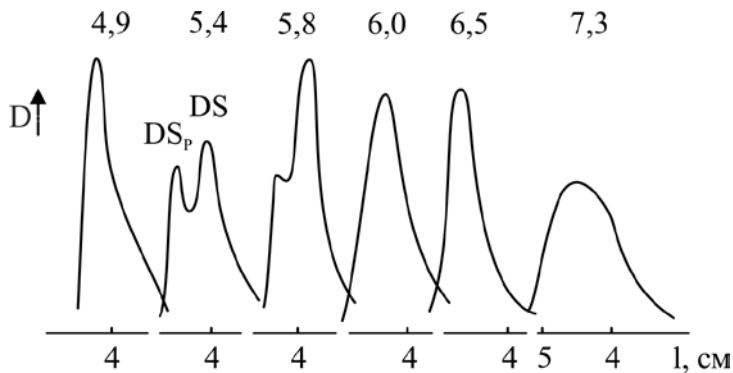


Рис. 8. Денситограми полі(А)_s за різних рН (величини рН вказано над зонами). 1,0 %-ва агароза; I = 14-15 мМ. Тут і нижче: D – оптична густина, l – відстань від старту

Вузька зона при рН ~ 6,5 відповідає *DS*-формі, подвійні зони – суміші *DS*- і *DS_p*-форм, причому формі *DS_p* відповідає частина подвійної зони, яка мігрує швидше; зона при рН 4,9, головним чином, відповідає формі *DS_p* полі(А). Перекривання електрофоретичних зон у області співіснування форм, швидше за все, пояснюється не тільки близькістю величин електрофоретичних характеристик *DS*- і *DS_p*-форм, а й тим, що ці форми знаходяться у динамічній рівновазі (Adler et al., 1969; Lerner & Kearns, 1981).

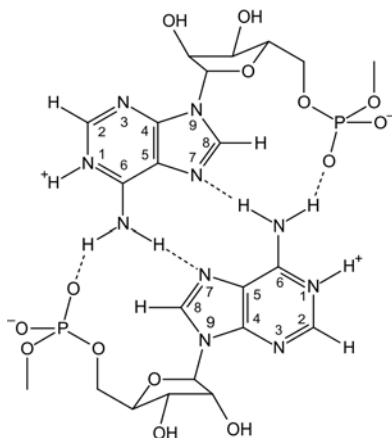


Рис. 9. Схема утворення пар основ у формі *DS_p* полі(А) (Rich et al., 1961). Пунктиром зображено міжмолекулярні Н-зв'язки

Дослідження впливу похідних амінокислот на структурні переходи в полі(А) показало, що взаємодія цього гомополімера з дикатіоном ефіру аргініну призводить до часткового переходу форми *DS* у форму *DS_p* (рис. 10).

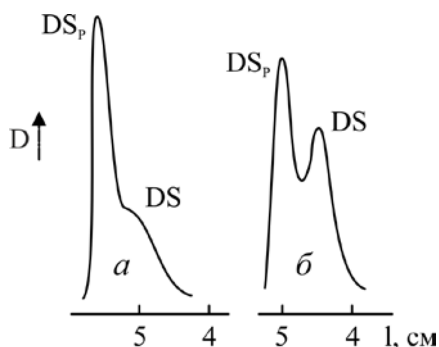


Рис. 10. Денситограми полі(А)_s за присутності (а) і за відсутності (б) 0,8 мМ ефіру аргініну. I = 14 мМ; 1,0 %-ва агароза; рН 5,3

Слід зазначити, що за кислих рН обидві форми полі(А) реєструються методом електрофорезу тільки за відносно низьких іонних сил (< 30 мМ), при вищих І спостерігається одна зона полімеру. Можливі два пояснення. Електрофоретичні рухливості DS - і DS_p -форм полі(А) можуть по-різному залежати від І, і за високих іонних сил, на відміну від низьких, їхні значення можуть зближуватися. З іншого боку, від іонної сили може залежати час переходу однієї форми в іншу. За високих іонних сил переходи можуть бути настільки швидкими, що при електрофорезі спостерігається тільки одна зона з проміжним значенням рухливості. За низьких іонних сил, внаслідок збільшення ефективних розмірів макромолекул і їхньої жорсткості, переходи сповільнюються і реєструються дві форми.

Електрофоретичне дослідження замороженої форми полі(А). Препарати полі(А) в дослідах, результати яких представлено на рис. 8 і 10, підкисляли таким чином, аби запобігти утворенню так званої «замороженої» форми (див. «Матеріали і методи»). Якщо не застосовувати спеціальних підходів, то полі(А) утворює за кислих рН (внаслідок неправильної підгонки ланцюгів) об'ємні агрегати, що складаються з одно- і дволанцюгових ділянок (Janik et al., 1972). На рис. 11 показано результати електрофорезу полі(А), розчиненого в кислому буфері (суцільна лінія). Як видно, препарат розмитий вздовж всього шляху міграції, а за деяких умов його частина взагалі не проникає в гель і залишається на старті.

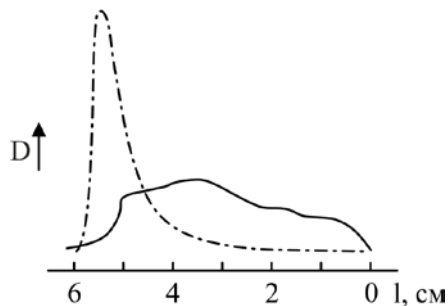


Рис. 11. Денситограми полі(А)_с. 0,8%-ва агароза; І = 43 мМ; рН препарату 5,5 – суцільна лінія, 7,5 – штрих-пунктирна лінія

Полегшити процес поділу ланцюгів і їхню подальшу правильну підгонку можна за допомогою діалізу нейтрального розчину полі(А) проти кислого буфера або прогріванням (Janik et al., 1972), або ж, як ми показали (рис. 11), – нанесенням нейтрального розчину препарату на кислий гель. Ми також показали, що вміст «замороженої» форми полі(А) зростає зі збільшенням довжини полі(А) та/або іонної сили розчину, тобто при зменшенні жорсткості полімерного ланцюга.

Ґрунтуючись на наших і літературних даних, ми припустили, що «заморожена» форма полі(А) виникає внаслідок одночасного утворення як міжмолекулярних, так і внутрішньомолекулярних подвійних спіралей (рис. 12). Для утворення внутрішньомолекулярного дуплексу макромолекула полі(А) мусить згорнутися сама на себе (рис. 12 *a-в*), оскільки ланцюги в подвійній спіралі полі(А) орієнтовані паралельно. При одночасній участі тієї ж самої молекули в утворенні як внутрішньо-, так і міжмолекулярних подвійних спіралей імовірність «розплутування» утвореної мультимолекулярної структури помітно зменшується і утворюється ядро «замороженої» форми (рис. 12 *з*). Пізніше Kim et al. (2011) припустили існування внутрішньомолекулярного дуплексу в полі(dA), досліджуючи цей гомополімер методом FRET (fluorescence resonance energy transfer) і FSC

(fluorescence correlation spectroscopy). Крім того, припущення про утворення внутрішньомолекулярної вторинної структури в полі(А) висловлювали й інші автори (Steiner & Beers, 1959; Smith et al. 1997), але без конкретизації її структурної моделі.

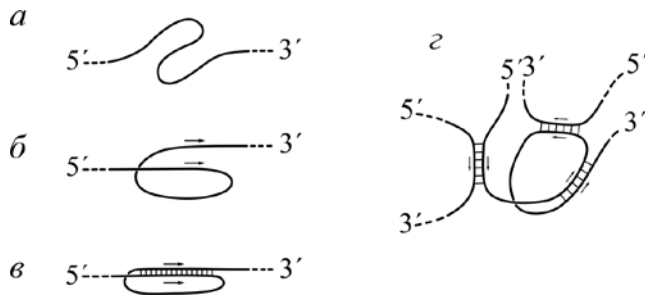


Рис. 12. Схеми утворення внутрішньомолекулярної подвійної спіралі в полі(А) (а-в) та зародку «замороженої» форми полі(А) (г). Стрілками позначено 5' → 3'-напрямок ланцюгів

Таким чином, отримані нами результати свідчать про високу ймовірність утворення внутрішньомолекулярного дуплекса в полі(А).

Дослідження структурних переходів у гомополімерах методом протонної буферної ємності. Наявність пари двохспіральных форм полі(А) підтверджено спектроскопічно, а також іншими методами, включаючи електрофорез. Проте всі ці методи мало придатні для з'ясування детальної картини структурних переходів. Найбільш прийнятним для цієї мети виявився метод протонної буферної ємності (Опанасенко и соавт., 1978). Метод протонної буферної ємності полягає у диференціюванні кривої потенціометричного титрування і розкладанні отриманої кривої, тобто залежності буферної ємності від рН, на адитивні базисні функції, які відповідають протонуванню хімічних груп різної природи. Це значно покращує якість розкладання кривої титрування на адитивні криві титрування груп різного типу. Базисна функція груп і-го типу має такий вигляд:

$$\beta_i(\text{pH}) = \frac{c_i \gamma_i \ln 10}{10^{\gamma_i(\text{pH} - \text{pK}_i)} + 10^{\gamma_i(\text{pK}_i - \text{pH})} + 2},$$

де c_i , — концентрація здатних до іонізації атомних груп і-го типу, що визначають і-й пік на кривій буферної ємності, pK_i — термодинамічний параметр іонізації атомних груп і-го типу, γ_i — параметр кооперативності.

На рис. 13 показано криву рН-залежності буферної ємності полі(А), обчислену як різницю кривих для розчину полі(А) і розчинника, та результат її розкладання на адитивні базисні функції. Оскільки крива буферної ємності полімера — це сума кривих, що відповідають однотипним групам ($\gamma \leq 1$) і рН-індукованим структурним переходам ($\gamma > 1$), то з рис. 13 випливає, що при протонуванні полі(А) мають місце три структурних переходи: один висококооперативний ($\text{pK } 6,16 \pm 0,01$) і два менш кооперативних ($\text{pK } 5,97 \pm 0,01$ і $5,00 \pm 0,01$). Залучаючи літературні дані (Adler et al., 1969; Finch & Klug, 1969; Janik et al., 1972), перший (найвужчий) пік ототожнено нами з утворенням DS -форми, а другий пік, який перекривається з першим, — з утворенням DS_p -форми. Що стосується піку 3, то Lerner & Kearns (1981), досліджуючи переходи в полі(А) методом ЯМР, припустили, що при наближенні до повністю протоновану стану DS -форма зазнає невеликих конформаційних змін. Цю форму полі(А), вперше експериментально зареєстровану нами іншим незалежним

методом, ми назвали DS' . Четверта базисна функція відображає процес некооперативного ($\gamma = 1$) приєднання протонів до двохспірального полі(A).

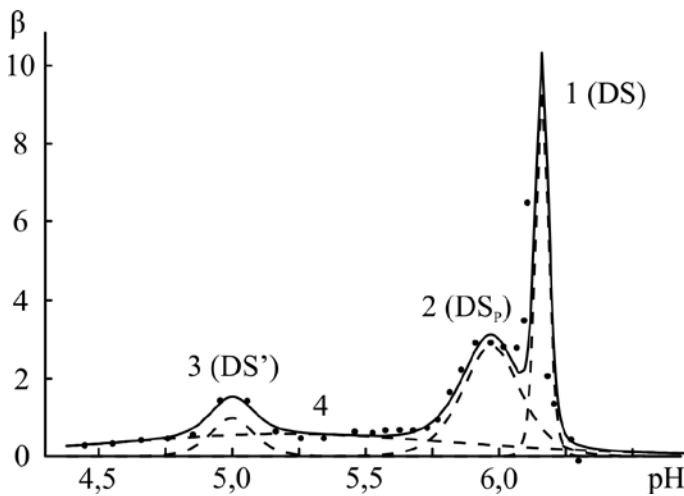


Рис. 13. Крива протонної буферної ємності полі(A)_R і її розкладання на адитивні складові. $I = 0,05$ М; температура $13,5$ С°; Загальна концентрація полі(A) (c) дорівнює $2,8$ мМ. Пунктирні лінії – базисні функції; суцільна лінія – сумарна крива. Параметри кооперативності γ_i для піків 1, 2, 3 і 4 дорівнюють 27 ± 3 , $6 \pm 0,5$, $8 \pm 0,5$ та 1 відповідно. Параметри c_i/c цих піків дорівнюють $0,2 \pm 0,03$, $0,27 \pm 0,02$, $0,07 \pm 0,01$ та $0,33 \pm 0,1$ відповідно

Щоб проілюструвати характер розподілу окремих форм полі(A) у процесі протонування, ми побудували модельну діаграму, показану на рис. 14. Її «модельність» полягає лише у тому, що її побудовано для довільно обраного (з певного інтервалу) значення концентрації DS_p -форми (c_2/c) при рН, за якого завершився процес її кооперативного утворення. У разі полі(A) метод протонної буферної ємності не дозволяє точно визначити концентрації різних двохспіральних форм, а лише оцінити їх. Характер зображених на діаграмі кривих не залежить від вибраного значення концентрації. Це означає, що форма DS_p полі(A) утворюється у два етапи: на першому етапі кооперативно (але з меншим ступенем кооперативності, ніж форма DS), а потім її вміст поступово збільшується за рахунок дисоціації форми DS .

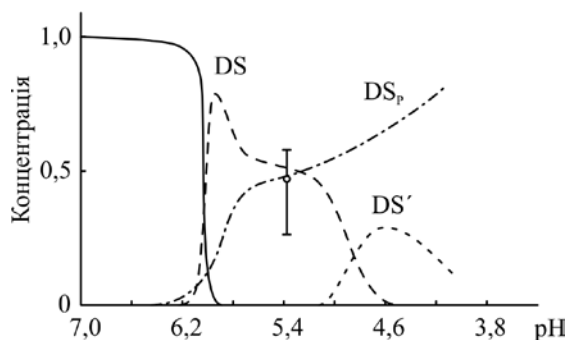


Рис. 14. Залежність концентрації окремих форм полі(A) (у відносних одиницях) від рН при $I = 0,05$ М. Суцільна лінія відноситься до нейтральної форми. \circ - обрано значення c_2/c із зазначеного інтервалу

Ми провели також диференціювання і розкладання на адитивні базисні функції потенціометричних кривих титрування полі(A) (Steiner & Beers, 1959; Holcomb & Timasheff, 1968) і визначали параметри базисних функцій для всіх кислих форм полімеру за різних іонних сил і температур. Виявилось, що ступінь перекривання піків 1 і 2 та послідовність появи DS - та DS_p -форм залежить від умов експерименту. Так, зокрема, при $I = 0,01$ М і температурі 26 С° форма DS з'являється при підкисленні фактично за нижчих значень рН, аніж форма DS_p .

Гіпотеза про стабілізацію полі(А) вертикальними Н-зв'язками. Грунтуючись на спостереженні, що контакти між аміногрупами сусідніх основ в моделі одноланцюгової спіралі полі(А) досить близькі (рис. 15 а), зроблено припущення, що односпіральний полі(А) може бути стабілізований не тільки стекінг-взаємодіями, а й так званими вертикальними Н-зв'язками ...N6H...N6H...N6H... (Говорун, 1999). Ці зв'язки утворюються між атомами водню та азоту екзоциклічних аміногруп сусідніх основ (рис. 15 б). Модель односпірального полі(А) з Н-зв'язками представлено на рис. 15, в. Ми висунули гіпотезу про те, що існування двох різних форм одноланцюгової полі(А) і двох різних дволанцюгових форм цього полімера пов'язано з наявністю або відсутністю вертикальних Н-зв'язків, які стабілізують *DS*-форму полі(А) і одну з двох одноланцюгових форм. Таким чином, в двохспіральних формах полі(А) один з атомів водню аміногрупи N6H бере участь в утворенні Н-зв'язку з атомом N7 протилежного ланцюга, а другий атом утворює Н-зв'язок або з фосфатом протилежного ланцюга (*DS_p*-форма), або вертикальний Н-зв'язок з азотом екзоциклічної аміногрупи сусідньої основи в цьому ж ланцюзі (*DS*-форма).

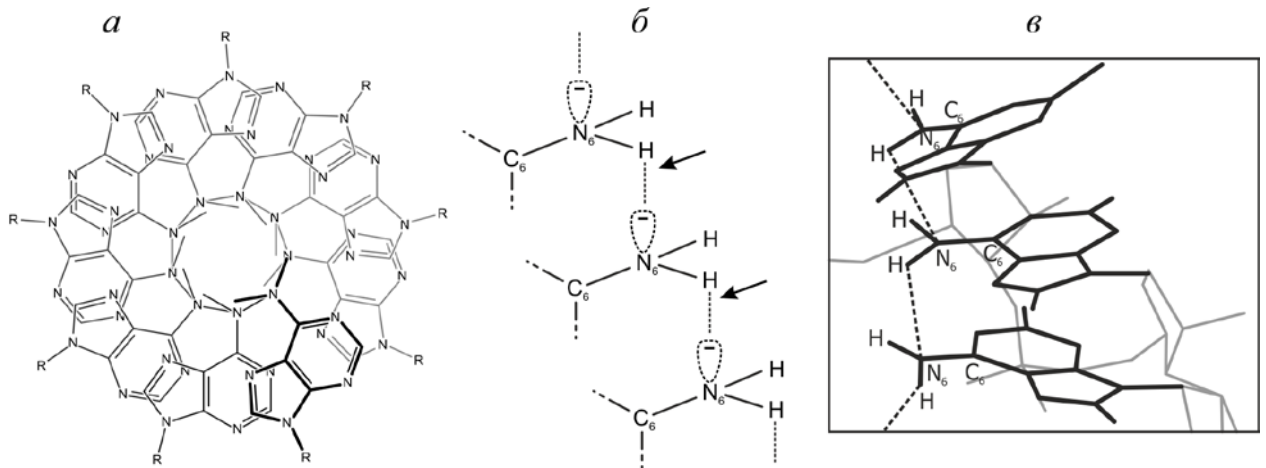


Рис. 15. Одноланцюговий полі(А) (а), вигляд вздовж осі, адаптовано з (Saenger et al., 1975); б – вертикальні Н-зв'язки (позначено пунктиром і стрілками); в – просторова модель одноланцюгового полі(А), стабілізованого вертикальними Н-зв'язками (позначені пунктиром)

Нові дані про властивості *DS*-форми, отримані нами, знаходяться у відповідності з гіпотезою про утворення вертикальних Н-зв'язків. По-перше, утворення цієї форми є висококооперативним процесом, характерним для утворення Н-зв'язків. По друге, *DS*-форма частково дисоціює за присутності дикатіона ефіру аргініну, а при збільшенні ступеня протонування полі(А) вона зазнає конформаційний перехід в *DS'*-форму. Ці властивості можна пояснити тим, що надлишковий позитивний заряд в макромолекулі полі(А) за присутності дикатіона аргініну або за високого ступеня протонування гомополімера зменшує структурну нежорсткість амінофрагмента аденіну, дестабілізуючи вертикальні Н-зв'язки. Це сприяє частковій дисоціації *DS*-форми або структурному переходу. Хоча припущення про вертикальні Н-зв'язки в полі(А) раніше в літературі не висловлювалися, ця гіпотеза не тільки не суперечить літературним даним але й

дозволяє пояснити цілу низку відомих експериментальних фактів (Griffin et al., 1964; Ikeda et al., 1970; Porschke, 1973, 1978; Scovell, 1978; Kononov & Bukina, 2002).

Наприклад, аналог полі(А), у якому один з атомів водню аміногрупи аденіну заміщений на метильну групу, не утворює подвійної спіралі (Griffin et al, 1964). Причина криється не у стеричних обмеженнях, оскільки при подальшій модифікації цього полімеру, тобто заміні атома водню при атомі вуглецю аденіну С2 на аміногрупу, подвійна спіраль утворюється, причому з тими ж N6H...N7 Н-зв'язками, що й у подвійних спіралях полі(А) (Ikeda et al., 1970). З цих даних випливає, що у даному випадку стабілізуючу роль відіграє аміногрупа у положенні 2, яка виходячи з нашої гіпотези, теж може утворювати вертикальні Н-зв'язки.

Структурні переходи в полі(С). *Залежність протонної буферної ємності полі(С) від рН.* Структурні переходи в полі(С), так само як і в полі(А), індукуються протонуванням основ. Однак вони мають різний характер внаслідок того, що в полі(А) протони, які приєднуються до нуклеотидних основ, не беруть участі в утворенні Н-зв'язків між ними (рис. 9), а в полі(С) – беруть (рис. 16).

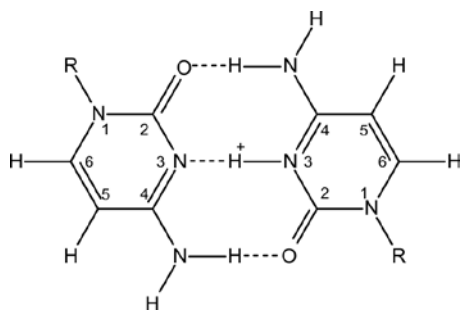


Рис. 16. Схема утворення пар основ у подвійній спіралі полі(С) (Akinrimisi et al., 1963; Langridge & Rich, 1963)

Зокрема, стабільність дуплекса полі(А) зростає із збільшенням ступеня протонування полімеру (α), а подвійна спіраль полі(С) за високих значень α руйнується. У літературі відсутня усталена думка про фізико-хімічні механізми протонування напівпротонованого дуплексу полі(С), у якому всі Н-зв'язки між основами вже утворені. Аби прояснити це важливе питання, ми вивчили методом протонної буферної ємності структурні переходи в полі(С). Криві протонної буферної ємності розраховували на основі літературних даних. Для прикладу на рис. 17 показано криву за даними (Klump, 1975). Вона має два вузьких піки і може бути задовільно представлена сумою чотирьох адитивних базисних функцій. Значення параметрів піків розраховували методом підбору таким чином, щоб сумарна крива якнайкраще збігалася із експериментальною кривою буферної ємності. При цьому певні труднощі виникають при підборі значень γ_i для дуже вузьких піків, подібних пікам 1 і 4, а також при підборі значень pK_i для невисоких, широких піків.

Вузький пік 1 ($pK = 5,64 \pm 0,01$) на кривій буферної ємності полі(С) (рис. 17) ототожнено з кооперативним процесом утворення подвійних спіралей, спричиненим протонуванням атому азоту N3 нуклеотидних основ. Широкий пік 2 ($pK = 5,30 \pm 0,1$) ми інтерпретуємо як процес некооперативного протонування подвійних спіралей полі(С) по атомах азоту N3 цитозинових основ, які ще не залучені в утворення пар за схемою, представленою на рис. 16, і, швидше за все, частково експоновані в розчин. Широкий пік 3 ($pK = 3,5 \pm 0,1$) відповідає процесу некооперативного

приєднання протонів до подвійної спіралі полі(С) іншої природи, аніж у випадку піку 2. Його віднесено до некооперативного протонування атома кисню електронейтральних цитозинових основ з *цис*-орієнтацією приєданого протона відносно глікозидного зв'язку.

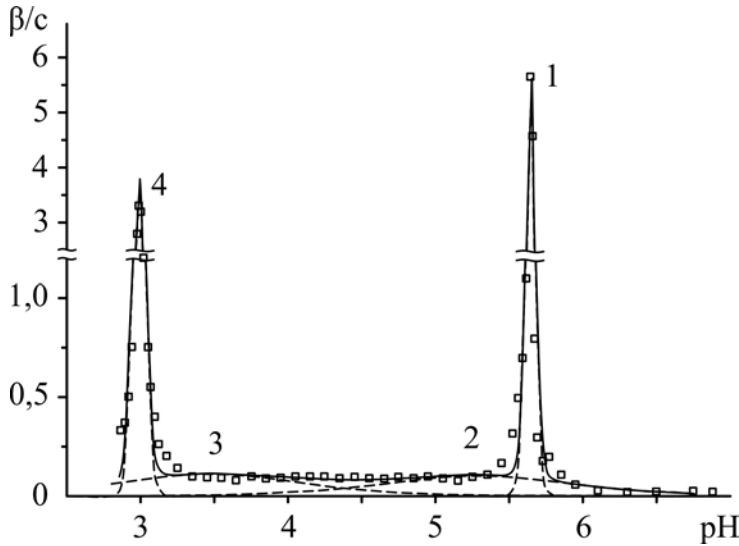


Рис. 17. Крива протонної буферної ємності полі(С), розрахована за даними роботи (Klump, 1975), та її розкладання на складові. Пунктирні лінії – адитивні базисні функції; суцільна лінія – сумарна крива. Температура 25 °С; 0,1 М NaCl; 0,5-3,0 мМ полі(С). Параметри γ_i піків 1, 2, 3 і 4 дорівнюють 30 ± 5 , 1, 1 і 20 ± 5 відповідно. Параметри c_i/c цих піків дорівнюють $0,34 \pm 0,01$, $0,18 \pm 0,1$, $0,18 \pm 0,1$ і $0,31 \pm 0,01$ відповідно

Ця реакція знижує термодинамічну стабільність подвійної спіралі полі(С), спричиняючи в решті-решт її дисоціацію. Вузкий пік 4 ($pK = 2,99 \pm 0,01$) відповідає протонуванню одноланцюгових ділянок, які утворюються при розпаді подвійних ланцюгів полі(С). Кооперативне приєднання протонів обумовлено кооперативним процесом розпаду подвійних спіралей.

Виявлення методом електрофорезу двох різних форм протонowanego полі(С). На рис. 18 показано денситограми полі(С) за різних рН та іонних сил 13-14 мМ. За даними потенціометричного титрування (не показано), рК переходу полі(С) з одноланцюгової форми у дволанцюгову при $I = 14$ мМ становить 6,10.

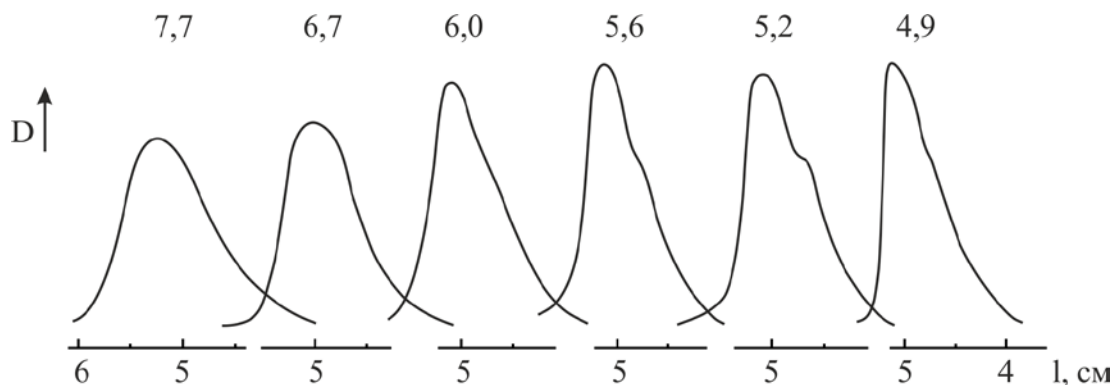


Рис. 18. Денситограми полі(С)_R за різних рН в трис-ацетатному буфері. $I = 13 - 14$ мМ, 0,8%-ва агароза. Над зонами вказано величини рН

На рис. 18 видно, що за рН, вищих аніж рК переходу, спостерігається одна зона полі(С), а при нижчих – дві зони, що перекриваються, причому денситограми за рН 4,9-6,0 відносяться до тієї області рН, де перехід у подвійну спіраль вже

завершено, а розпад дуплексів ще не розпочався. Також видно, що обидві кислі форми полі(С) одночасно присутні у розчині при всіх значеннях рН нижче рК переходу і зі зменшенням величини рН їхня відносна частка практично не змінюється. Важливо відзначити, що в експерименті, результати якого представлено на рис. 18, на гелі, приготовані за різних значень рН, наносили полі(С), розчинений при рН 7,6, тобто структурні переходи полімера з нейтральної форми в кислоту відбувалися безпосередньо при входженні зразка в агарозний гель. Якщо ж полі(С) розчиняли у кислих розчинах і в них же проводили електрофорез, то відносна кількість повільніше мігруючої форми збільшувалася, як це, наприклад, видно на рис. 19 *a* і *в*. Збільшенню відносною кількості повільніше мігруючої форми сприяє також підкислення зразка, розчиненого у слабколужному буфері, і його короткочасне прогрівання (рис. 19 *б* і *з*). За кислих рН дві зони полі(С), що перекриваються, спостерігаються, на відміну від полі(А), у широкому інтервалі іонних сил – від 7 мМ до 70 мМ.

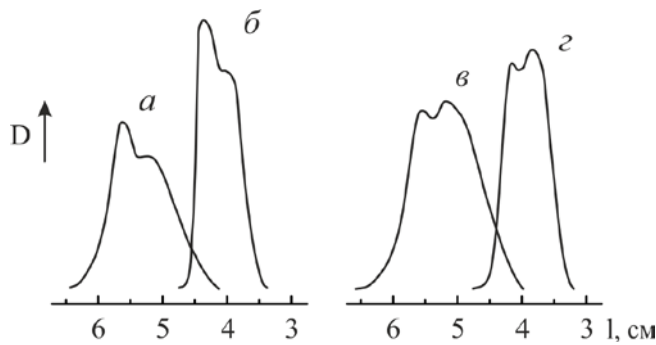


Рис. 19. Денситограми полі(С)_R за різних іонних сил. 0,8 %-ва агароза; рН ~ 5,5; трис-СН₃СООН буфер; *a*, *в* – I = 6,7 мМ; *б*, *з* – I = 25,9 мМ; *a*, *б*, *з* – зразок розчинений при рН 7,5, *в* – при рН 5,5; *з* – зразок прогрітий

Яка ж природа двох електрофоретичних зон полі(С), що спостерігаються за кислих рН? Враховуючи той факт, що С-багаті олігонуклеотиди РНК здатні утворювати так званий і-(intercalated) мотив (Guéron & Leroy, 2000), ми припустили, що при електрофорезі кислих розчинів полі(С) спостерігаються дві форми полімера – дво- і чотирьохланцюгова. За допомогою додаткових експериментів ми виявили, що наявність двох зон не є специфічною особливістю препарату полі(С) і не обумовлена специфічним впливом компонентів електрофоретичного буфера на полінуклеотид, а також що повільніше мігруюча зона протонованого полі(С) не належить до «замороженої» форми полі(С). Зокрема, трис-ацетатний буфер містить недисоційовані карбоксильні групи, які здатні стабільно зв'язуватися з цитозином і цитидином (Samijlenko et al., 1998). Ці групи могли би перешкоджати утворенню подвійної спіралі полі(С) і повільніше мігруюча зона полімера могла би належати до його одноланцюгової форми. Проте дві зони кислого полі(С) спостерігали не тільки в трис-ацетатному, а й в трис-фосфатному буфері. Дві кислі форми полі(С) не фіксуються методом протонної буферної ємності, ймовірно, тому, що протонування спричиняє утворення тих же самих пар основ Сyt·Сyt⁺ (рис. 16) як у випадку подвійної спіралі полі(С), так і у випадку і-мотиву, і механізм розпаду цих форм теж однаковий.

Petrovic & Polavarapu (2006), досліджуючи ІЧ-спектри і спектри коливального кругового дихроїзму полі(С), а також Cohen et al. (2008), ґрунтуючись на результатах дослідження динаміки збуджених станів напівпротонованих dC₁₈ та

полі(С), припустили, що полі(С) може утворювати і-мотив. Отримані нами результати в сукупності з цими літературними даними дозволяють з великою імовірністю припустити, що зареєстрована методом електрофорезу повільніше мігруюча зона протонowanego полі(С) відноситься саме до і-мотиву.

Результати електрофорезу дали нову інформацію, корисну для подальших досліджень. По-перше, вони показали, що за кислих рН утворюється не одна з двох можливих форм полі(С) – дуплекс або тетраплекс, а обидві форми присутні в розчині одночасно. Цей факт не враховувався ні у вищенаведених роботах, у яких полі(С) досліджувався спектроскопічними методами, ні в роботі (Langridge & Rich, 1963), де цей гомополімер досліджували методом рентгеноструктурного аналізу. Слід зазначити також, що структурну модель дуплексу полі(С) донині так і не запропоновано. По-друге, ми вперше показали, що зі зменшенням величини рН відносна кількість кислих форм полі(С) практично не змінюється, тобто обидві форми утворюються, швидше за все, лише у тому інтервалі рН, коли в розчині одночасно присутні, як одно-, так і дволанцюгові макромолекули, тобто під час переходу полі(С) із нейтральної форми в кислу, і подальших перетворень одних форм в інші, як це спостерігається для полі(А), вже не відбувається. Враховуючи цей факт, ми запропонували схему утворення і-мотиву, яку представлено на рис. 20. Відповідно до цього механізму, за наявності затравочної кількості дуплексів наступні дуплекси формуються безпосередньо на них; нуклеотидні основи одиночних ланцюгів інтеркалюють між парами основ вже наявної подвійної спіралі, спричиняючи утворення нових пар і врешті-решт – чотирьохланцюгової структури.

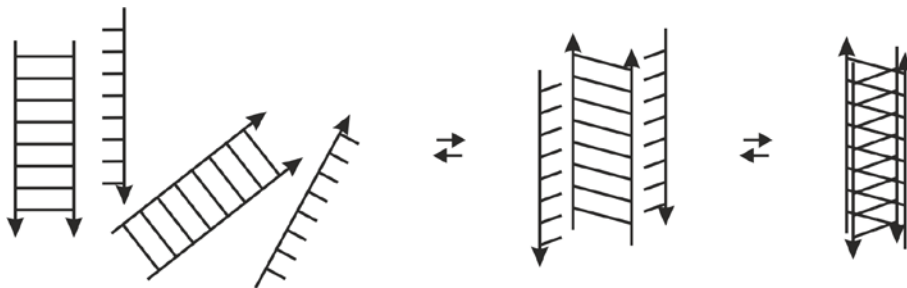


Рис. 20. Схема, що ілюструє процес утворення і-мотиву полі(С)

Наші уявлення про те, що «самозбирання» і-мотиву полі(С) проводиться на дуплексі, знаходяться у відповідності з даними роботи Leroу (2009), опублікованій пізніше, де досліджено кінетику утворення і-мотиву дезоксинуклеотидів [ТС₃₋₅]₄.

Структурні переходи в полі(С). За нейтральних і слабкокислих рН структурні переходи в полі(С) індукуються зміною концентрації солі в розчині. Однак літературні дані про те, за яких значень концентрації катіонів відбувається перехід полі(С) з односпіральної форми в чотирьохспіральну, суперечливі (Fresco & Massoulié, 1963; Souleil & Panijel, 1968; Rice et al., 1973; Лесник и соавт., 1980). Щоб прояснити це важливе питання, полі(С) досліджено нами методом електрофорезу за низьких іонних сил, оскільки в описаних вище електрофоретичних експериментах за іонних сил > 10 мМ (при рН від 7,8 до 4,9) спостерігалася лише одна вузька симетрична зона полімеру. На рис. 21 представлено результати електрофорезу

препарату полі(G) ($I = 14,2$ мМ) за іонних сил $5,6$ мМ (зони *a*, *в*) і $14,4$ мМ (зона *б*). Як видно з рис. 21, при $I = 14,4$ мМ зона полі(G) вузька і досить симетрична, а при $I = 5,6$ мМ лідируюча границя зони *A* має помітне плече. Отримані результати можна пояснити тим, що за низьких іонних сил (< 10 мМ) чотирьохланцюговий полі(G) частково дисоціює з утворенням одноланцюгової форми, яка мігрує з більшою швидкістю, ніж квадруплекс.

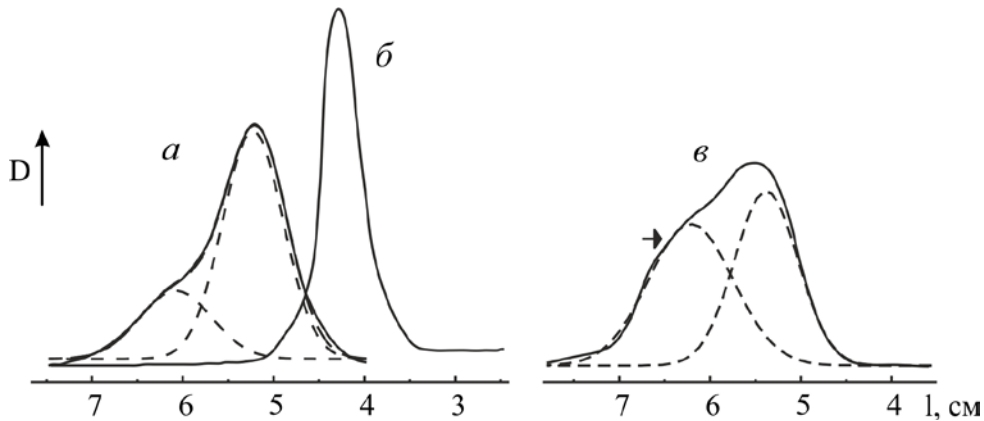


Рис. 21. Денситограми полі(G)_S за різних іонних сил, рН $\sim 7,0$; 0,8 %-ва агароза; *a*, *в* – $I = 5,6$ мМ, *б* – $I = 14,4$ мМ; *в* – зразок прогрітий протягом 15 хв за $90-93$ °С. Стрілкою позначено точку, в якій знято електронний спектр поглинання, представлений на рис. 22 (спектр 2)

В умовах дослідження зони цих форм полімера частково перекриваються. Поява плеча у зони *a* свідчить про те, що дисоціація квадруплексу при зменшенні іонної сили сталася під час електрофорезу, швидше за все, відразу ж після входження зразка в гель. Зона *в* на рис. 21 відноситься до препарату полі(G), попередньо прогрітого при $I = 5,6$ мМ протягом 15 хвилин за температури $90-93$ °С і охолодженого протягом 1 год за кімнатної температури. Видно, що після прогрівання відносна кількість швидше мігруючої форми полімера помітно збільшилася (приблизно в 1,7 рази). Цей результат можна пояснити тим, що одноланцюгові макромолекули полі(G), які утворилися у результаті плавлення квадруплекса, не встигли за час охолодження повністю реасоціювати, оскільки утворення чотирьохланцюгової форми полімера є реакцією четвертого порядку.

Отримані результати свідчать на користь того, що згадуване плече зони полі(G) зумовлено появою за низьких іонних сил саме одноланцюгової форми полімера, а не якимось іншими причинами. Отже, наше дослідження полі(G) методом електрофорезу продемонструвало, що за іонної сили, яка дорівнює або вища 14 мМ, полімер знаходиться у чотирьохланцюговій формі, а при $I = 4-6$ мМ $20-30\%$ молекул полінуклеотиду перебувають у одноланцюговому стані. Результати наших досліджень найбільш близькі до даних Rice et al. (1973), отриманих методом Раманівської спектроскопії.

Електронні спектри поглинання толуїдинового блакитного О (ТБ), зв'язаного з гомополірибонуклеотидами в агарозних гелях. Різні гомополінуклеотиди забарвлюються ТБ у різні кольори (при рН $7,5$). Це свідчить про те, що барвник

взаємодіє з ними по-різному. Для того, аби з'ясувати, як ТБ взаємодіє з різними формами полі(G) та інших гомополінуклеотидів, гелі фарбували ТБ, розчиненим у тих же буферних розчинах, у яких проводили електрофорез, тобто за різних рН і іонних сил. Отримані результати представлено на рис. 22. Видно, що спектри ТБ, зв'язаного зі швидше і повільніше мігруючими формами полі(G), значно відрізняються один від одного: $\lambda_{\text{макс}}$ спектра 2 зміщений приблизно на 20 нм у довгохвильову область у порівнянні з $\lambda_{\text{макс}}$ спектра 3. Ці дані додатково підтверджують наш висновок про те, що за низьких іонних сил полі(G) співіснує у двох різних формах.

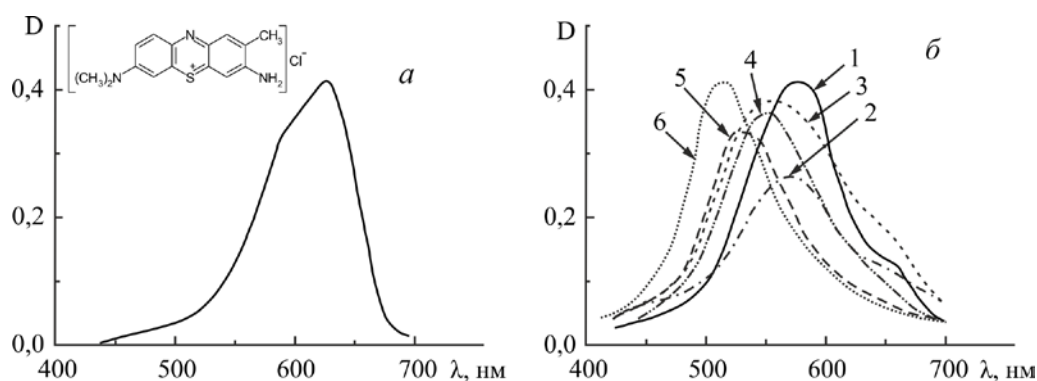


Рис. 22. Електронні спектри поглинання вільного ТБ (а) і ТБ, зв'язаного з гомополірибонуклеотидами в агарозних гелях (б). $I = 4-6$ мМ. 1 – полі(А), рН 4,9; 2 – одноланцюговий полі(Г), рН 7,0; 3 – чотирьохланцюговий полі(Г), рН 7,0; 4 – полі(С), рН 5,7; 5 – полі(У), рН 7,6; 6 – полі(С), рН 7,6

Порівняння спектра ТБ, зв'язаного з одноланцюговим полі(Г), зі спектрами барвника, зв'язаного з іншими гомополімерами, показує, що цей спектр (2), найбільш близький до спектра ТБ, зв'язаному з полі(А) (1), а спектр ТБ, зв'язаного з чотирьохланцюговою формою полі(Г) (спектр 3), близький до спектра барвника, зв'язаного з чотирьохланцюговою формою полі(С) (спектр 4), проте форми спектрів різні. Спектри ТБ, зв'язаного з одноланцюговими формами піримідинових гомополінуклеотидів полі(У) (спектр 5) та полі(С) (спектр 6), близькі між собою, але помітно відрізняються від спектрів інших гомополінуклеотидів. Їхні $\lambda_{\text{макс}}$ найбільшою мірою зміщені у короткохвильову область у порівнянні з $\lambda_{\text{макс}}$ вільного ТБ. У цілому різниця $\lambda_{\text{макс}}$ ТБ, зв'язаного з полі(А) і одноланцюговим полі(С), становить приблизно 70 нм.

Слід зазначити, що пофарбовані ТБ зони всіх гомополірибонуклеотидів і їхніх форм, представлених на рис. 22, відрізняються за кольором візуально: полі(А) виглядає бузково-блакитним, полі(Г) та і-форма полі(С) мають різні відтінки бузкового і фіолетового кольорів, а полі(У) і одноланцюговий полі(С) – різні відтінки рожевого кольору.

Структурні моделі залучення асоціатів гомополімерів у біологічні процеси.

Можливе залучення внутрішньомолекулярних подвійних спіралей оліго(А) у біологічні процеси. Враховуючи, що внутрішньомолекулярні подвійні

спіралі полі(А) можуть утворюватися у клітині (див. «Актуальність теми»), ми запропонували і обґрунтували структурні механізми низки біологічних процесів за участю двохспіральных оліго(А)-трактів (табл. 1).

Таблиця 1

Можлива участь внутрішньомолекулярних дуплексів оліго(А) в біологічних процесах

Процес	Білки, які беруть участь у процесі	Мотиви PABs, що зв'язують полі(А)
Стабілізація мРНК GAP-43 (за участю елемента ARE)	<u>HuD</u>	RRM3
Стабілізація мРНК β -казеїну (за участю елемента ARE)	<u>HuR</u> <u>PABPC</u>	RRM3 RRM1+RRM2
Стабілізація мРНК <i>c-fos</i> (за участю елемента mCRD)	<u>PABPC</u> , PAIP1, UNR, AUF1, NSAP1	RRM1+RRM2
Стабілізація мРНК α -глобіну (за участю С-багатого елемента)	<u>PABPC</u> , α CP1, α CP2, AUF1	RRM1+RRM2
Саморегуляція синтезу PABPC	<u>PABPC</u> , IMP1, UNR	RRM1+RRM2
Контроль довжини полі(А)-хвостов мРНК вищих еукаріотів	PAP, CPSF, <u>PABPN1</u>	RRM
Контроль довжини полі(А)-хвостов мРНК дріжджах	Pap1, CPF, CF I, <u>Nab2</u> , <u>Pab1p</u>	ZnF5+ZnF6+ZnF7, RRM1+RRM2

Примітка. Підкреслено різні полі(А)-зв'язувальні білки.

Механізми всіх цих процесів досі достеменно не встановлено. Зокрема, відомо, що білки, які відносяться до сімейства Hu/ELAV, переважно взаємодіють з довгими молекулами полі(А) (> 100-150 нт) (Ma et al., 1997; Beckel-Mitchener et al., 2002; Nagaoka et al., 2006). Ці білки двома мотивами RRM зв'язуються із елементом ARE в РНК, а третім – з полі(А)-хвостом і стабілізують мРНК. Згідно нашої моделі, стабілізація зумовлена утворенням внутрішньомолекулярного дуплексу, який перешкоджає дії полі(А)-нуклеаз (рис. 23).

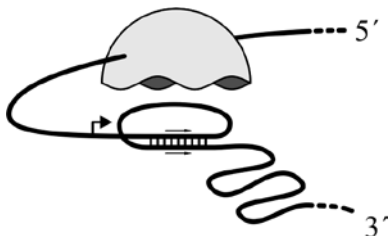


Рис. 23. Модельна схема утворення внутрішньомолекулярної подвійної спіралі оліго(А) у процесі стабілізації мРНК Hu/ELAV-білками. Початок полі(А)-хвоста позначено зігнутою стрілкою

Подібний механізм можна запропонувати також для стабілізації мРНК *c-fos* і α -глобіну, але в цих випадках комплекси білків збираються на інших сигнальних елементах в 3' НТО (табл. 1), а з полі(А)-хвостом зв'язується цитоплазматичний полі(А)-зв'язувальний білок PABPC. Інша модель відноситься до процесу саморегуляції цитоплазматичного білка PABPC. При надлишку PABPC у цитоплазмі він разом з іншими білками зв'язується з А-багатою ділянкою, розташованою в 5'-

нетрансльованій області своєї мРНК (Patel & Bag, 2006). Взаємодія білків з цією ділянкою стає завадою для просування рибосомної субчастинки 40 S вздовж мРНК у пошуках кодону ініціації, тобто призводить до пригнічення синтезу білка. Ми припустили, що у цьому випадку оліго(А)-дуплекс утворюється під дією білків, що взаємодіють з РАВРС, а затримка руху рибосомної субчастинки відбувається внаслідок того, що внутрішньомолекулярний дуплекс з паралельно орієнтованими ланцюгами, ймовірно, не є субстратом для дії геліказ, які беруть участь в ініціації трансляції.

Утворення внутрішньомолекулярного дуплексу може також лежати в основі механізму контролю довжини полі(А)-хвостів мРНК еукаріотів. Зокрема, процесивний синтез полі(А)-хвостів про-мРНК вищих еукаріотів припиняється, коли довжина полі(А)-последовності сягає ~ 250 нт (Eckmann et al., 2011). Цей ефект можна відтворити у системі *in vitro* за присутності всього лише трьох білків – полі(А)-полімерази, фактора специфічності розщеплення та поліаденілування CPSF і ядерного полі(А)-зв'язувального білка РАВРН1. Ми припустили, що при досягненні певної довжини полі(А), т. е. ступеня покриття полі(А)-последовності, що синтезується, молекулами РАВРН1, створюються сприятливі умови для формування внутрішньомолекулярної подвійної спіралі у полі(А)-хвості перенесенням протонів від надзвичайно кислих N-кінцевих доменів білків РАВРН1. Різкий перехід частини одноланцюгового полі(А)-хвоста в подвійну спіраль буде сприяти розпаду комплексу білків, що здійснюють процесивне поліаденілування (наприклад в результаті «висмикування» з цього комплексу молекули РАВРН1) та, як результат, – перехід від процесивної реакції поліаденілування до дистрибутивної. Процес поліаденілування про-мРНК дріжджів здійснюється іншим комплексом білків. У цьому випадку білок Nab2 може виконувати функцію, аналогічну тій, яку виконує білок РАВРН1.

Молекулярні моделі участі G-квадруплексів РНК у біологічних процесах.
Структурні моделі області димеризації геномної РНК ВІЛ-1. Проведені нами філогенетичні дослідження декількох сотень геномів ВІЛ-1 виявили, що за шпилькою DIS (dimerisation initiation site), відповідальною за ініціацію димеризації геному, розташована низка консервативних G-багатих трактів (GRS) (рис. 24).

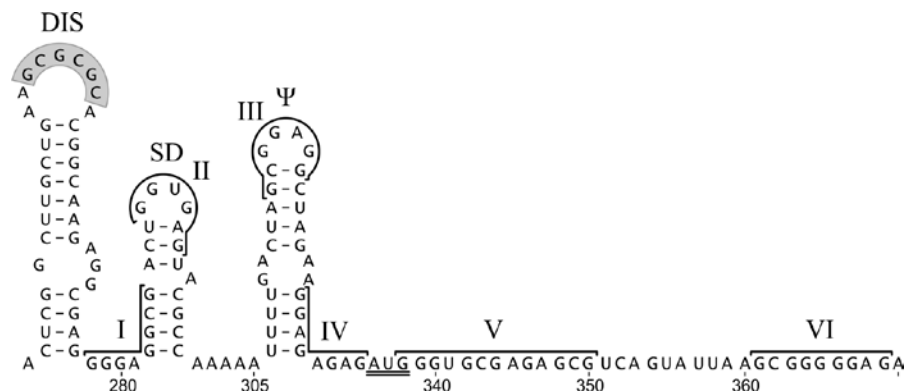


Рис. 24. G-багата область геномної РНК ВІЛ-1_{Lai}, що розташована за DIS. Паліндром в апікальній області DIS затінено. G-багаті тракти окреслено лінією. Кодон ініціації трансляції гена *gag* підкреслено подвійною лінією

Ці тракти здатні утворювати квадруплекси, що включають як G-тетради, так і тетради із залученням інших основ. Вони знаходяться у шпильках SD (splicing donor) і Psi (packaging signal), а також на початку гена *gag*. Ми припустили, що під дією нуклеокапсидного білка в зрілих віріонах ці тракти згортаються у міжмолекулярні димерні G-квадруплекси, які стабілізують димер, утворений взаємодією між паліндромами шпильок DIS. Наявність низки GRS сприяє утворенню G-квадруплексів з різних наборів трактів і забезпечує, тим самим, стабілізацію за наявності різноманітних мутацій. На рис. 25 показано одну зі структурних моделей DLS для геному ВІЛ-1_{Lai}.

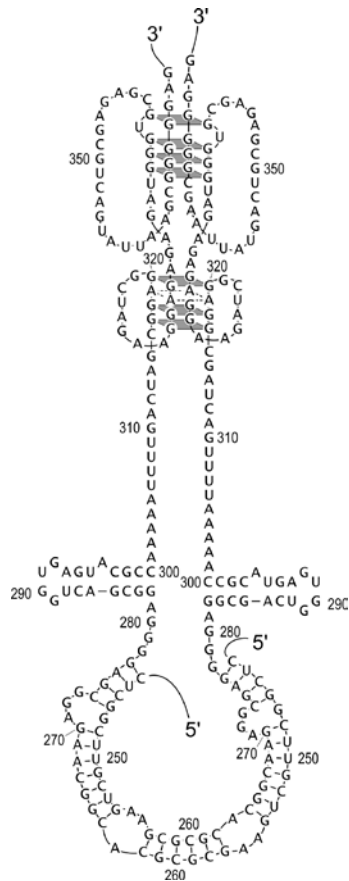


Рис. 25. Структурна модель області димеризації геномної РНК ВІЛ-1_{Lai}. Різні тетради виділено по-різному. Нуклеотиди пронумеровано тільки на одній з геномних РНК

Додатковий зв'язок між мономерними РНК ВІЛ-1 поблизу шпильки DIS через G-квадруплекси важливий, на наш погляд, як для збереження контакту між двома геномами у процесі зворотної транскрипції під час синтезу всього мінус-ланцюга ДНК, так і для процесу рекомбінації.

Структурна модель полі(A)-сайту про-мРНК вірусу SV40 L. G-багата послідовність (G rich sequence, GRS) в полі(A)-сайті про-мРНК SV40 L грає роль «нижнього» допоміжного елемента (AuxDSE) (Bagga et al., 1998). З нею зв'язується білок гяРПН Н/Н', стимулюючи реакцію поліаденілування. Hans & Alwine (2000) досліджували структуру цього полі(A)-сайту за допомогою ферментативного зондування, але не представили його модель через невідповідність між результатами зондування та результатами комп'ютерного передбачення вторинної структури. Пізніше ми згорнули цю послідовність за допомогою новітньої програми (mfold) і

вперше показали, що отримана структура (рис. 26 а) узгоджується з вищезгаданими результатами зондування.



Рис. 26. Структура основного сайту поліаденілування про-мРНК SV40 L за відсутності (а) і за присутності G-квадруплекса (б). Полі(A)-сигнал (гексамер AAUAAA) і URE (U-rich element) відзначено лініями. Місце розщеплення та приєднання полі(A)-хвоста позначено стрілкою

GRS і основні елементи полі(A) сайту в цій структурі (гексамер AAUAAA і U/GU-багатий «нижній» елемент DSE) великою мірою залучені до утворення пар основ і мало доступні для білків апарату поліаденілування. Звернувши увагу на те, що GRS має потенціал для утворення G-квадруплекса, ми згорнули послідовність полі(A)-сайту з урахуванням цього факту (рис. 26 б). У цьому випадку основні елементи виявилися експонованими. Пізніше Decorsière et al. (2011) експериментально підтвердили, що GRS з про-мРНК SV40 L здатний утворювати G-квадруплекс і що білок гЯРП Н/Н' може з ним зв'язуватися. Таким чином, у даному випадку основною функцією G-квадруплекса є забезпечення оптимальної структури полі(A)-сайту.

Структурна модель комплексного полі(A)-сайту про-мРНК ВІЛ-1. Ми виявили, що мінорні допоміжні елементи (upstream sequence elements, USEs) полі(A)-сайту про-мРНК ВІЛ-1 розташовані у консервативному GRS з високим потенціалом утворення численних G-квадруплексів (рис. 27).

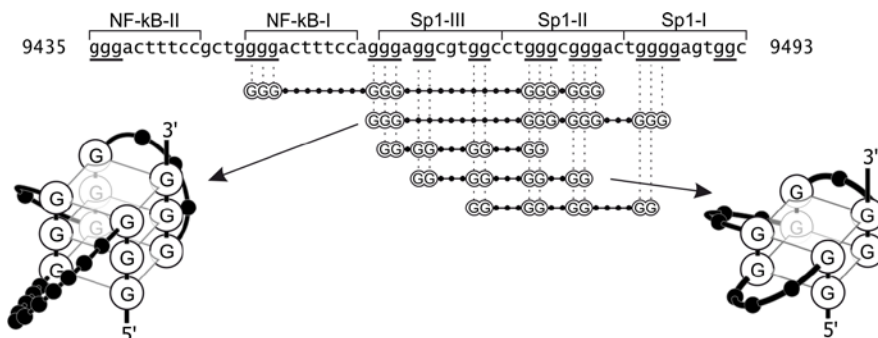


Рис. 27. G-багата область в про-мРНК НХВ2 ВІЛ-1 і приклади G-квадруплексів з трьома і двома G-тетрадами. G-повтори підкреслено. Місце знаходження сайтів зв'язування для білків NF-кВ і Sp1 зазначено дужками

У провірусної ДНК ця область містить місця зв'язування для білків NF-κB і Sp1, що беруть участь у процесі ініціації транскрипції. Цей GRS, як правило, містить дев'ять G-повторів, які можуть утворювати різні G-квадруплекси. На рис. 27 показано лише деякі комбінації G-повторів, а також гіпотетичні просторові схеми окремих G-квадруплексів. Білок гяРНП Н, можливо, стимулює й стабілізує G-квадруплекси. Небезпідставно припустивши, що область геному ВІЛ-1, яка розташована за G-квадруплексами, може згортатися автономно, ми вперше запропонували модель вторинної структури комплексного полі(А)-сайту про-мРНК ВІЛ-1.

На рис. 28 показано дві альтернативні структури (лінійну і доменну), які утворюються в оптимальних структурах або ж структурах з близькою вільною енергією у більшості (55-87%) з досліджених нами (приблизно 1500) геномів ВІЛ-1 різних субтипів.

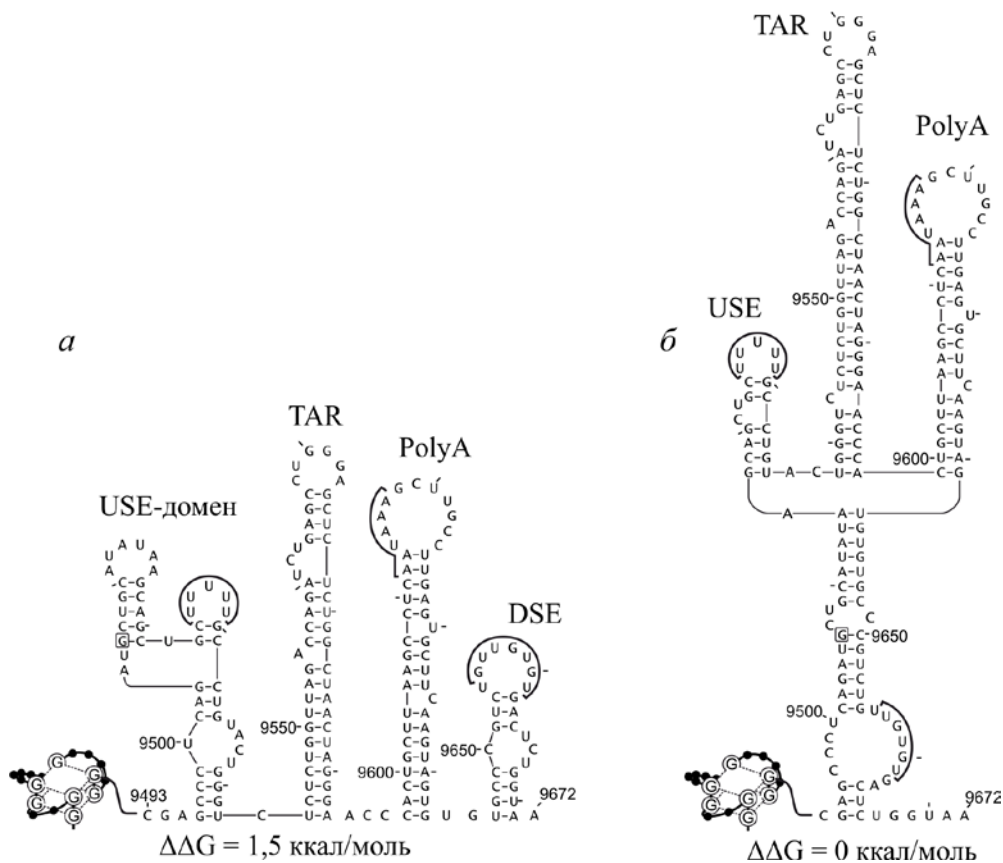


Рис. 28. Лінійна (а) і доменна (б) структури комплексного полі(А)-сайту про-мРНК AD8 ВІЛ-1 (номер AF004394 в GenBank). Нумерація нуклеотидів така ж, як і у геномі НХВ2. Заміщену основу в позиції 9506 (порівняно з геномом НХВ2) окреслено квадратом. U-багатий тракт USE, гексамер AAUAAA і U/GU-багатий DSE відзначено лініями

Ці структури включають добре відомі шпильки TAR і polyA, що утворюються на обох кінцях транскрипта, а також нові структурні елементи – домен USE та шпильки USE і DSE. У запропонованій моделі U-багатий тракт USE і U/GU-збагачений DSE знаходяться в одноланцюговій формі, доступній для білків апарату

поліаденілування, що свідчить про функціональну компетентність моделі. Її особливість полягає в тому, що ми вперше запропонували для G-квадруплексів роль меж самодостатніх доменів (тобто ділянок, які згортаються незалежно одна від одної) при передбачанні вторинної структури довгих РНК. Слід зазначити, що наприкінці 2014 року у роботі Perrone et al. приведено експериментальні докази утворення різних G-квадруплексів у G-багатій області геномної РНК ВІЛ-1, що відповідає GRS, показаному на рис. 27. Це свідчить про адекватність запропонованих нами модельних уявлень.

База полі(A)-сайтів про-мРНК людини. У 2001 році ми першими опублікували повідомлення про те, що відразу за сайтами поліаденілування про-мРНК вищих еукаріотів та їхніх вірусів нерідко зустрічаються G-багаті ділянки, здатні утворювати G-квадруплекси. Для детальнішого вивчення цього важливого питання ми створили і проаналізували базу полі(A)-сайтів про-мРНК людини. Ця база містить 244 геномні послідовності, що охоплюють ділянки, розташовані за 200 нт до точно встановленого місця розщеплення транскрипту (-200/-1 нт) і 200 нт за ним (+1/+200 нт). Невеликий фрагмент бази в області -70/+70 нт показано на рис. 29. У більшості випадків у ділянці -35/-16 нт може бути знайдено основний сигнал поліаденілування PAS (гексамер AAUAAA або його похідні), з яким зв'язується фактор поліаденілування CPSF, а в області +1/+30 нт присутній U/GU-багатий DSE – місце зв'язування фактора стимулювання розщеплення CstF. На відміну від PAS, локалізованих, в основному, у вузькій області -35/-16 нт, U/GU-багаті «нижні» елементи фактично розподілені в межах всієї ділянки довжиною 70 нт (рис. 29). Вони значно різняться за довжиною. В одному і тому ж полі(A)-сайті нерідко зустрічаються два і більше елементів. Ми припустили, що «нижня» область полі(A)-сайтів вищих еукаріотів складається з пентамерів, розташованих на різних відстанях один від одного, причому вони можуть перекриватися між собою. До них відносяться URE типу «чотири U з п'яти» (Chen et al., 1995), а також, як впливає з аналізу літератури, всі можливі комбінації «двох GU і одного U».

Наявність множинних U/GU-багатих трактів у полі(A)-сайтах про-мРНК людини знаходиться у відповідності з новою моделлю структури комплексу білків, що здійснюють процес поліаденілування про-мРНК вищих еукаріотів (Shi et al., 2009). Згідно з цією моделлю, комплекс містить стабільне ядро, що складається з CPSF, CstF і фактора розщеплення CFI. З ним взаємодіють інші фактори поліаденілування, а також різні білки, які беруть участь у координації процесу поліаденілування з іншими клітинними процесами. Два фактори CstF і CFI можуть бути представлені у білковому комплексі у вигляді димерів. Вважається, що одночасне зв'язування одного або ж обох факторів з двома сигнальними елементами сприяє підвищенню специфічності і міцності РНК-білкової взаємодії

Фактор CFI специфічно зв'язується з елементом UGUAN (Yang et al., 2011). В нашій базі елементи UGUAN зустрічаються в області -200/-1 нт приблизно у половині, а в області -70/-1 нт – у 28% транскриптів. Отримані дані свідчать про те, що CFI, мабуть, стимулює процес поліаденілування двома способами. У першому випадку цей фактор спільно з CPSF і CstF бере участь у формуванні стабільного РНК-білкового комплексу на основному полі(A)-сайті, а за наявності трактів

UGUAN – додатково стабілізує комплекс взаємодією між цими трактами і субодиницею CFI25.

a

A GTGACCAGATGCCCTACTCAGCTTCCATCACCCCTAGCAATATGTATTAAAGTCTGAAGTGTGGCCATGG
 ACRBP GTCCCAGAGAGGGCCACGGTGGGAGCTGCGCCCTCCTTAAAAGATGACTTTACATAAAAATGTTGATCTTC
 ACTA2 TCATTCCTAGCCAAAGCTCTGACTCGTTACCTATGTGTTTTTAATAAATCTGAAATAGGCTACTGGTAA
 ACTG2 ACAGGTTCTCCAAGGATCCCCCTCGAGACTACTCTGTTACCAGTCATGAAACATTAAAACSTACAAGCSTT
 ACY1 ACCTCCTCTTCCCCCTTCCAAATAATAAAGTCTATGGACAGGGCTGTCTCTGAAGTACTAACAACAAGGAC
 AIF1 ATATGGAAACAGAAGACAAAATTTGTAAGCCAGAGTCAACAAATTAAAATAAAATTACCCCTCCTCCAGATC
 ALDH3A2 CAGATATACCCTATTGGAGACAATCCTTTGATCATAAATTCTCCCCAACTTATAAATCATTTTATGTCTTT
 ALDOB GTCTTAGCAGTGGTAGGTTGGGAAGGAGATAGCTGCAACCAAAAAAGAAATAAATATTCTATAAACSTTC
 ANXA8 ACTGGGTACCTGGAGATTCTGAAGTGCCTTTGCTGTGGTTTTCAAATAATAAAGATTTGTATTCAACTC
 ATP6V0B GTGTCCCCCACCTCCACCCTCAACCCATCTTCCCTAGTGTGTTGTGAAATAAACTTGGTATTTGTCTGGGTC
 ATP6V1E1 GTAAATGTGATTTAAAATCTAAGCCATGAATATGCTTTATTTATTAAAAGAGTTATGCGGATTTAATGTG
 B3GALT5 GACTTTACTTTGTACTCAGAGAAGAGGCCTCACATGGCTGTGTCATATAAATGTTGGACTAAACTCTT
 BACE2 GCCACTATCACATATGCTTACTCTTGCTTAAAATAATAAATCATGTTTTGATGAGAAAAAATATTCTA
 BAT3 CCTCATCAGGGACCGTTTTCCCCCTCTTCCCTTACAGTATTTAAGAAATAAAAGTCGGATTTTTCTGGC

б

A AAACCTCAGTGTCCAGTGTACTGCGGTGGAAAGGGCTTGGAGGGTGGAGTGGCTCACAGGGGACACGAC
 ACRBP AGCCTGTGTGGCCTGTTCTGGTTATGATCCCCATCCTCAGCACTGCTACCCTGCCCGTGGCAGTCAGTC
 ACTA2 CTTCTTGGCCTGGCCCTCCGATCAATACTCGACTGATACCATTTGTAGGTTGACCTCACCCGTTACAGGA
 ACTG2 ACTTCTCTGTGTGGGGCTCTTTTTCTGCGGCTATGTCTCATACACAGTGCTAAGGACTTTTCACACATT
 ACY1 ACTCGTGGAGCAAGAATTTTCTTTTCTGCGGACATGTTACCATCTCCATTTACAGATGAGGAAACTG
 AIF1 AAGTCAGCTTAGTTTTTATTTGGGTGATTTTTTCTGCGGTTTGGGAAGGAGAGACAGGTCTTGAGGGAA
 ALDH3A2 ATCATAGATGGTTATTTGTCAACTTTTTTTTCTCATTTTAAATTTCTTAGCTGAGAAGATTTTCTCAAAC
 ALDOB AGCTGCTATCGGGTTTCATTTTTCTGCTCTTGCTGTCCAAAGACTCAGTGTATTTCATTACTTTTGACTC
 ANXA8 AAAGTATCTTTGGATGTTTTAGCAGGGACCAGTGTAGGACCAATTTAATTTTGTGAGAAACAGAGCTTTGGG
 ATP6V0B AGTGCAGCTTCTGTTGCCCTCTTGCGTCCCGTTTACAGAGGAAGGGTAAAGAGGCCTGTACGCCTCAGC
 ATP6V1E1 ATTTTCTAGTGTAAGGCACSTACAAATTTAGTTTTTGACAGAGTCAAATTTCTTACTGAGGCACSTAGAAAAG
 B3GALT5 ACTTGAACSTCAGGAAAAGTTACTTGCTGCAAAATGTTTTTGACCATGTTCAATTGCAAAAGTACGTCTGA
 BACE2 TTTCACTAGCTTAGGTTGTCTCTTTTTTCAAATCTTCTGGAAGTAGGTTGGCTATTACCCTGTTGGGAA
 BAT3 TGCTTTTTCTCTCTACATTTGTCTCCATTAGGTAGTTGTGTCCCTTAATCTTTGTGTGAATTTTTTTAATTAAT

Рис. 29. Фрагмент бази полі(А)-сайтів про-мРНК людини. -70/-1 нт (*a*) +1/+70 нт (*б*). Виділено PAS (*a*) і U/GU-багатий нижній елемент DSE (*б*)

Розподіл транскриптів з нашої бази полі(А)-сайтів за наявністю допоміжних елементів сайтів поліаденілування USE і AuxDSE, які зустрічаються найчастіше, наведено у таблиці 2. Зокрема, з USE, які можуть бути описані консенсусом UAU₂₋₅GUNA (Natalizio et al., 2002), специфічно зв'язуються чотири білка – p54nrb, PTB, PSF і U1A, позитивно впливаючи на процес поліаденілування (Hall-Pogar et al., 2007). Приблизно 8 % про-мРНК мають місця для зв'язування білка PTB (polypyrimidine tract binding protein), (Romanelli et al., 2013). Консенсусна послідовність для взаємодії PTB з РНК – це довгий поліпіримідиновий тракт (15-25 нт), що включає елементи UCUU та/або CUCUCU. Згаданий білок може брати участь у процесі поліаденілування, зв'язуючись з іншими білками (Millevoi et al., 2009). С-багаті послідовності, що включають не менше трьох близько розташованих оліго(С)-трактів (завдовжки ≥ 3 нт), можуть зв'язуватися з білками α CPs і

стимулювати процес поліаденілування, взаємодіючи з CPSF, сімплекіном і PAP (Ji et al., 2011).

Таблиця 2.

Допоміжні елементи у базі полі(А)-сайтів про-мРНК людини

Елемент	Ділянка, нт	Білок, який зв'язує елемент	% про-мРНК, які містять даний елемент
UAU ₂₋₅ GUNA	-40/-200	p54 ^{nrb} , PTB, PSF, U1A	16
UCUU, CUCUCU	-200/+200	PTB	8
Три тракти оліго(С) (≥ 3 нт)	-200/+200	αCPs	11
U-багаті тракти	-70/-1	CPSF	23
GGGA/U, GGGGGC	-70/-1	гяРНП Н, Н'	23
	+1/+70		46
G-квадруплекси	-70/-1	гяРНП Н, Н'	4
	+1/+70		16
і-мотиви (≥ 5 пар С ⁺ -С)	-70/-1	-	4
	+1/+70		2

Слід зазначити, що білки PTB і αCPs при зв'язуванні з віддалено розташованими трактами, можуть димеризуватися і в результаті експонувати послідовність, розташовану між ними (Du et al., 2008; Romanelli et al., 2013). Відповідно, згортання такої послідовності буде відбуватися автономно зі зміною структури прилеглих областей. Таким чином, при передбачанні вторинної структури РНК необхідно враховувати не тільки можливість утворення G-квадруплексів та і-мотивів, але й наявність місць зв'язування PTB і αCPs. U-багаті USE служать додатковим місцем зв'язування для CPSF. У разі про-мРНК ВІЛ-1 (Klasens et al., 1999) попереднє зв'язування CPSF з таким елементом сприяє ефективному збиранню апарату поліаденілування на полі(А)-сайті, у якому гексамер AAUAAA експонований не повністю. Консенсусну послідовність для U-багатих USE ще не визначено. Ймовірно, їхньою характерною особливістю є наявність оліго(U)-трактів.

Відомі AuxDSEs менш численні, ніж «верхні». До них, зокрема, відносяться тракти GGGA/U або GGGGGC (Caputi & Zahler, 2001; Fogel et al., 2002), з якими зв'язується білок гяРНП Н/Н', стимулюючи реакцію поліаденілування (Arhin et al., 2002; Millevoi et al., 2009). Слід зазначити, що стимулювання реакції поліаденілування G-багатими трактами корелює зі стабільністю комплексів, утворених цими трактами з білком гяРНП Н (Arhin et al., 2002). Враховуючи, що GRS в про-мРНК SV40 L, який утворює високостабільний комплекс із білком гяРНП Н, може згортатися в G-квадруплекс, можна припустити, що цей білок зв'язується з G-квадруплексом міцніше, ніж з окремими G-багатими трактами, і основну роль у стимулюванні поліаденілування відіграють саме ті GRS, які мають потенціал для утворення чотирьохланцюгових структур. Приблизно 35% про-мРНК у нашій базі полі(А)-сайтів містять в області -200/+200 нт ділянки, здатні згортатися в G-квадруплекс і ~ 12 % про-мРНК містять у досліджуваній області (-200/+200 нт) ділянки, здатні утворювати і-мотив з 5-9 парами основ С⁺·С.

Особливо слід підкреслити, що полі(А)-сайти про-мРНК людини значно відрізняються між собою як за наявністю допоміжних елементів, так і за організацією основних сайтів. Фактично кожен комплексний полі(А)-сайт є специфічним. Це означає, що процес термінації транскрипції є не менш складним і не менш важливим для регуляції експресії генів, аніж процес її ініціації.

ВИСНОВКИ

Вперше методами аналітичного електрофорезу і протонної буферної ємності вивчено природу структурних переходів у гомополірибонуклеотидах – виявлено нові характеристики переходів, запропоновано і обґрунтовано механізми утворення низки їхніх форм у залежності від умов середовища, а також представлено структурні моделі участі гомоолігонуклеотидних трактів у деяких біологічних процесах. Отримані результати важливі для подальшого з'ясування детальних структурних механізмів біологічних процесів, що ґрунтуються на взаємодії широко розповсюджених клітинних білків з регуляторними трактами гомополі(оліго)нуклеотидів про-мРНК і мРНК.

1. З метою виявлення впливу іонної сили на ефективні розміри полінуклеотидів вперше експериментально визначено значення ефективного діаметра подвійної спіралі ДНК d_{ef} за проміжних іонних сил I розчину. При зменшенні I від 100 до 10 мМ величина d_{ef} збільшується приблизно в 3 рази. Виміри проведено за допомогою розробленого нами осмометра з малим часом встановлення рівноваги.
2. Методом аналітичного електрофорезу вперше показано що:
 - DS -форма полі(А) має меншу електрофоретичну рухливість, ніж форма DS_p при $I < 30$ мМ, а при вищих I значення рухливостей зближуються. Дикатійон ефіру аргініну сприяє переходу форми DS в DS_p -форму;
 - ефективність утворення «замороженої» форми полі(А) зростає при збільшенні іонної сили і розміру макромолекул, тобто за умов, коли підвищується їхня гнучкість;
 - полі(С) за кислих рН існує у двох різних формах, співвідношення яких не змінюється зі зміною рН;
 - полі(Г) при $I < 10$ мМ присутній у двох формах, які додатково зафіксовані спектроскопією електронного поглинання ТБ, зв'язаного с полі(Г). Повільніше мігруюча форма співвіднесена з G-квадруплексами, а швидше мігруюча – з одноланцюговою формою.
3. Вперше методом протонної буферної ємності:
 - визначено параметри структурних переходів (рК, концентрація здатних до іонізації атомних груп і параметр кооперативності) в полі(А) та полі(С) за різних іонних сил і температур;
 - зареєстровано третій структурний перехід в полі(А), який раніше постулювали, спираючись на результати ЯМР-спектроскопії.

- зафіксовано додатковий некооперативний процес протонування подвійної спіралі полі(С), пов'язаний із протонуванням атомів кисню непротонованих основ, який індукує її дисоціацію.
4. На основі отриманих у роботі експериментальних результатів висунуто та обґрунтовано наступні припущення:
 - дві різні односпіральні форми полі(А) і дві його різні двохспіральні форми відрізняються наявністю або відсутністю вертикальних водневих зв'язків ...N6H...N6H...N6H... між сусідніми основами;
 - заморожена форма полі(А) виникає в результаті одночасного утворення як міжмолекулярних, так і внутрішньомолекулярних подвійних спіралей в протонованому гомополімері;
 - повільніше мігруюча кисла форма полі(С) є і-мотивом. Вона утворюється тільки під час структурного переходу формуванням тетраплексів з подвійних спіралей і одиночних ланцюгів.
 5. Вперше запропоновано та обґрунтовано молекулярні моделі втягнення внутрішньомолекулярних дуплексів оліго(А) у процеси стабілізації мРНК під дією білків, що відносяться до сімейства Nu/ELAV, саморегуляції синтезу цитоплазматичного полі(А)-зв'язувального білка, термінації поліаденілування про-мРНК та ін.
 6. Вперше запропоновано та обґрунтовано низку структурних моделей за участю G-квадруплексів:
 - модель області димеризації геномної РНК ВІЛ-1, у якій димер, утворений шпильками DIS, стабілізується квадруплексами, що містять як G-тетради, так і тетради із залученням інших основ;
 - модель полі(А)-сайта про-мРНК вірусу SV-40, у якій G-квадруплекс відіграє структурну роль, забезпечуючи доступність основних сигнальних елементів для білкового апарату поліаденілування;
 - модель комплексного полі(А)-сайта про-мРНК ВІЛ-1, а також майже всієї 3'-нетрансльованої області транскрипта. У цьому випадку G-квадруплекс виконує функцію 5'-межі домена, який згортається автономно.
 7. Вперше проведено широкомасштабне (~ 1500 геномів) філогенетичне дослідження структурних елементів сайту поліаденілування про-мРНК ВІЛ-1. Ці дані можуть бути корисними для конструювання терапевтичних антивірусних агентів, спрямованих на інгібування функцій сигнальних елементів, важливих для реплікації вірусного генома.
 8. Вперше створено та проаналізовано базу сайтів поліаденілування 244 про-мРНК людини в області -200/+200 нт. Встановлено, що ~ 35% про-мРНК містять в цій області послідовності, здатні утворювати G-квадруплекс, а ~ 12% транскриптів мають послідовності, здатні утворювати і-мотив. Показано також, що більшість транскриптів містять різні допоміжні елементи сайтів поліаденілування (USEs і AuxDSEs). Ці результати свідчать про те, що регуляція термінації транскрипції, тобто поліаденілування є не менш важливим процесом, аніж регуляція її ініціації.

Перелік основних наукових праць, опублікованих за темою дисертації

1. The primary and secondary structures of HIV-1 genomic RNA region encompassing DIS, SD and Psi hairpins: *in silico* study / M. I. Zarudnaya, I. M. Kolomiets, A. L. Potyahaylo, D. M. Hovorun // In: "Trends in RNA Research"; edited by P. A. McNamara. – New York: Nova Science Publishers, 2006. – P. 159–189. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, безпосередня участь у написанні тексту розділу.*
2. Osmotic pressure of DNA solutions and effective diameter of the double helix / E. G. Yarmola, M. I. Zarudnaya, Yu. S. Lazurkin // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1985. – Vol. 2, N 5. – P. 981–993. *Особистий внесок здобувача – огляд літератури за темою роботи, самостійне виконання експериментів, безпосередня участь у написанні статті.*
3. Определение констант связывания гомополирибонуклеотидов с производным лизина методом электрофореза в агарозных гелях / М. И. Зарудная, Н. В. Желтовский // Молекуляр. биология. – 1989. – Т. 23, № 1. – С. 215–224. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, самостійне виконання експериментів, написання статті.*
4. Исследование взаимодействия гомополирибонуклеотидов с дикатионом эфира лизина методом аффинного электрофореза / М. И. Зарудная, Н. В. Желтовский // Молекуляр. биология. – 1992. – Т. 26, № 1. – С. 110–117. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, самостійне виконання експериментів, написання статті.*
5. Электрофоретическое исследование конформационных переходов в поли(А) при кислых рН / М. И. Зарудная, Н. В. Желтовский // Молекуляр. биология. – 1995. – Т. 29, № 5. – С. 1040–1047. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, самостійне виконання всіх експериментів, написання статті.*
6. Исследование конформационных переходов в поли(А) методом буферной ёмкости / М. И. Зарудная // Молекуляр. биология. – 1998. – Т. 32, № 3. – С. 508–514.
7. Структурні переходи в поліаденіловій кислоті. Можливі молекулярні механізми функціонування полі(А)-хвостів мРНК / М. І. Зарудна, Д. М. Говорун // Доповіді НАН України. – 1998. – № 12. – С. 155–160. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, самостійне виконання експериментів, написання статті.*
8. Самоасоциаты гомополимерных трактов клеточных РНК: физические механизмы образования и функционирования / М. И. Зарудная, Д. Н. Говорун // Фізика живого. – 1999. – Т. 7, № 2. – С. 38–52. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, самостійне виконання експериментів, написання статті.*
9. Hypothetical double-helical poly(A) formation in a cell and its possible biological significance / M. I. Zarudnaya, D. M. Hovorun // IUBMB Life. – 1999. – Vol. 48, N 6. – P. 581–584. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, написання статті.*

10. The double-helical forms of poly(A) can be formed in a cell and participate in biological processes / M. I. Zarudnaya, D. M. Novorun // Comments Mol. Cell. Biophys. – 2000. – Vol. 10, N1. – P. 53–62. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, написання статті.*
11. Конформационные переходы поли(С) и поли(dС): исследование методом протоной буферной емкости / М. И. Зарудная, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун // Biopolym. Cell. – 2000. – Vol. 16, N 6. – P. 495–504. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, розрахунок кривих буферної ємності полі(С) і розкладання їх за адитивними базисними функціями, написання статті.*
12. Полиаденилирование про-мРНК. 1. Образование 3'-концов мРНК позвоночных / М. И. Зарудная // Biopolym. Cell. – 2001. – Vol. 17, N 2. – P. 93–108.
13. Полиаденилирование про-мРНК. 2. Образование 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК дрожжей, растений, прокариотов и вирусов / М. И. Зарудная // Biopolym. Cell. – 2001. – Vol. 17, N 3. – P. 185–202.
14. Молекулярные механизмы сопряжения процессов терминации транскрипции и полиаденилирования про-мРНК / М. И. Зарудная, А. Л. Потягайло, Н. Э. Дзержинский, Д. Н. Говорун // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 2. – С. 28–32. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, написання статті.*
15. What nuclease cleaves pre-mRNA in the process of polyadenylation? / M. I. Zarudnaya, I. M. Kolomiets, D. M. Novorun // IUBMB Life. – 2002. – Vol. 54, N 1. – P. 27–31. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, непосредня участь в написанні статті.*
16. Structural transitions in polycytidylic acid: proton buffer capacity data / M. I. Zarudnaya, S. P. Samijlenko, А. L. Potyahaylo, D. M. Novorun // Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids. – 2002. – Vol. 21, N 2. – P. 125–137. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, розрахунок кривих буферної ємності полі(С) і розкладання їх за адитивним базисними функціями, непосредня участь в написанні статті.*
17. Auxiliary elements of mammalian pre-mRNAs polyadenylation signals / M. I. Zarudnaya, А. L. Potyahaylo, I. M. Kolomiets, D. M. Novorun // Biopolym. Cell. – 2002. – Vol. 18, N 6. – P. 500–517. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, непосредня участь в створенні бази даних полі(А)-сатів людини, непосредня участь в написанні статті.*
18. Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures / M. I. Zarudnaya, I. M. Kolomiets, А. L. Potyahaylo, D. M. Novorun // Nucleic Acids Res. – 2003. – Vol. 31, N 5. – P. 1375–1386. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення структурної моделі полі(А)-сайту про-мРНК SV40 L, непосредня участь в написанні статті.*
19. Структурная модель области димеризации генома вируса иммунодефицита человека HIV-1 / М. И. Зарудная, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун // Biopolym. Cell. – 2003. – Vol. 19, N 1. – P. 37–42. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення структурної моделі області димеризації генома ВІЛ-1, написання статті.*

20. Молекулярні механізми структурних переходів полі(C) і полі(dC), спричинених протонуванням, та їхнє квантово-хімічне обґрунтування / А. Л. Потягайло, М. І. Зарудна, Д. М. Говорун // Доповіді НАН України. – 2003. – № 2. – С. 196–199. *Особистий внесок здобувача – участь у написанні статті.*
21. Dimer linkage structure in retroviruses: models that include both duplex and quadruplex domains / М. І. Zarudnaya, I. M. Kolomiets, A. L. Potyahaylo, D. M. Novorun // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 5–15. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення структурних моделей областей димеризації геномів ретровірусів, непосредна участь у написанні статті.*
22. Diversity of DIS, SD and Psi hairpins in HIV-1 isolates of group M: *in silico* study / М. І. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, I. N. Kolomiets, D. M. Novorun // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 1. – Р. 68–84. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, непосредна участь у написанні статті.*
23. Электрофоретическое исследование конформационных переходов в поли(G) под действием моновалентных катионов / М. И. Зарудная, А. В. Степанюгин, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун // *Biopolym. Cell.* – 2007. – Vol. 23, N 2. – Р. 122–129. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, участь в виконанні експериментів, написання статті.*
24. Обнаружение методом электрофореза двух различных форм протонированного поли(C) / М. И. Зарудная, А. В. Степанюгин, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун // *Biopolym. Cell.* – 2008. – Vol. 24, N 1. – Р. 69–77. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, участь в виконанні експериментів, написання статті.*
25. Возможный механизм стабилизации одной из двух форм двуспирального поли(A) / М. И. Зарудная // *Biopolym. Cell.* – 2008. – Vol. 24, N 4. – Р. 333–339
26. Внутримолекулярные двухцепочечные спирали полиадениловой кислоты и их возможное биологическое значение / М. И. Зарудная, А. В. Степанюгин, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 4. – С. 74–81. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, участь в виконанні експериментів, написання статті.*
27. Вторичная структура основного поли(A) сигнала про-мРНК вируса иммунодефицита человека / М. И. Зарудная, А. Л. Потягайло, В. В. Отенко, И. Н. Коломиец, Д. Н. Говорун // Доповіді НАН України. – 2011. – № 4. – С. 170–176. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення моделі основного полі(A)-сайту про-мРНК ВІЛ-1, написання статті.*
28. Structural model of the complete poly(A) region of HIV-1 pre-mRNA / М. I. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, I. M. Kolomiets, D. M. Novorun // *J Biomol. Struct. Dyn.* – 2013. – Vol. 31, N 10. – Р. 1044–1056. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення моделі комплексного полі(A)-сайту про-мРНК ВІЛ-1, участь у написанні статті.*
29. Phylogenetic study on structural elements of HIV-1 poly(A) region. 1. PolyA and DSE hairpins / М. I. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, I. M. Kolomiets, D. M. Novorun // *Biopolym. Cell.* – 2013. – Vol. 29, N 6. – Р. 454–462. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз*

- послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, участь у написанні статті.*
30. Phylogenetic study on structural elements of HIV-1 poly(A) region. 2. USE domain and TAR hairpin / M. I. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, I. M. Kolomiets, D. M. Novorun // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, N 1. – P. 29–36. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, участь у написанні статті.*
 31. Эффективный диаметр ДНК в растворе: осмометрическое исследование / Ю. С. Лазуркин, Е. Г. Ярмола, М. И. Зарудная // Симпозиум с участием стран членов СЭВ и СФРЮ «Физико-химические свойства биополимеров в растворе и клетках», Пущино, СРСР. – 1985. – С. 75–76. *Особистий внесок здобувача – самостійне виконання експериментів.*
 32. Вивчення конформаційних переходів полі(А) при кислих рН методом електрофорезу / М. І. Зарудна // 1-з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, Україна. – 1994. – С. 104–105.
 33. Утворення дволанцюгових спіралей полі(А) та їхня можлива роль у біологічних процесах / М. І. Зарудна // II з'їзд Українського біофізичного товариства, Харків, Україна. – 1998. – С. 11.
 34. Co-operative formation of three double helical forms of poly(A): proton buffer capacity and electrophoresis data / M. I. Zarudnaya // Conference on physics of biological systems, Poushcha-Vodytsa (Kyiv), Ukraine. – 1998. – P. 52.
 35. The ...N6H...N6H... vertical hydrogen bonds contribute to the helical structure of single-stranded poly(A) / D. M. Novorun, A. L. Potyahaylo, M. I. Zarudna // XIV International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, Odessa, Ukraine. – 1999. – P. 146. *Особистий внесок здобувача – участь в написанні тез.*
 36. Структурные переходы в полиадениловой кислоте: возможное участие ее двухспиральных форм в биологических процессах / М. И. Зарудная // II съезд биофизиков России, Москва, Россия. – 1999. – С. 114–115.
 37. Mechanism of the polycytidylic acid protonation / M. I. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, D. M. Novorun // XIV International Roundtable “Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications”, San Francisco, USA. – 2000. – P. 136. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, розрахунок кривих буферної ємності полі(С) і розкладання їх по базисних функціях, участь в написанні тез.*
 38. Первинна, вторинна та третинна структура сигналів поліаденілування про-мРНК вищих еукаріотів / М. І. Зарудна, І. М. Коломієць, А. Л. Потягайло // VIII Український біохімічний з'їзд, Чернівці, Україна. *Укр. біохім. журн.* – 2002. – Т. 74, № 4б (додаток 2). – С. 32. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення структурної моделі полі(А)-сайту про-мРНК SV40 L, участь в написанні тез.*
 39. Mammalian pre-mRNA polyadenylation signals / M. Zarudnaya, A. Potyahaylo, I. Kolomiets, D. Novorun // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, Львів, Україна. – 2004. – С. 371 *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, участь в створенні бази даних полі(А)-сайтів людини, участь в написанні тез.*

40. The structures of DIS, SD and Ψ hairpins in HIV-1 genomic RNA: *in silico* study / M. I. Zarudnaya, I. M. Kolomiets, A. L. Potyahaylo, D. M. Novorun // I Українська наукова конференція «Проблеми біологічної і медичної фізики», Харків, Україна. – 2004. – С. 29. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, участь в написанні тез.*
41. The secondary structure of the region encompassing DIS SD and Ψ hairpins in genomic RNA of human immunodeficiency virus type-1: *in silico* study / M. I. Zarudnaya, I. M. Kolomiets, A. L. Potyahaylo, D. M. Novorun // IV міжнародна конференція «Біоресурси і віруси», Київ, Україна. – 2004. – С. 123–124. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, участь в написанні тез.*
42. Первичная и вторичная структуры области геномной РНК ВИЧ-1, включающей шпильки DIS SD и Ψ : филогенетический анализ / М. И. Зарудная, И. Н. Коломиец, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун // 5-я всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных болезней», Москва, Россия. – 2004. – С. 202–203. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, написання тез.*
43. Исследование конформационных переходов в гомополирибонуклеотидах методом электрофореза / М. И. Зарудная, А. В. Степанюгин, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун // IV з'їзд Українського біофізичного товариства, Донецьк, Україна. – 2006. – С. 295–296. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, участь в виконанні експериментів, написання тез.*
44. Extensive structural analysis of HIV-1 genomic RNA region encompassing DIS, SD and Psi hairpins / M. Zarudna, I. Kolomiets, A. Potyahaylo, D. Novorun // 5th European Conference on Clinical and Social Research on AIDS and Drugs, Vilnius, Lithuania. – 2009. – P. 57. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, участь в написанні тез.*
45. Database of the secondary structures of HIV-1 genome control elements / A. Potyahaylo, I. Kolomiets, M. Zarudnaya, D. Novorun // 34th FEBS Congress, Prague, Czech Republic. FEBS J. – 2009. – Vol. 276 (Suppl. 1). – P. 119. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, участь в створенні бази даних контрольних елементів геному ВІЛ-1, написання тез.*
46. Вторичная структура комплексного поли(А)-сигнала про-мРНК вируса иммунодефицита человека / М. И. Зарудная, А. Л. Потягайло, И. Н. Коломиец, Д. Н. Говорун // X Український біохімічний з'їзд, Київ, Україна. Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 1). – С. 27–28. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення структурної моделі комплексного полі(А)-сайту про-мРНК ВІЛ-1, написання тез.*
47. Secondary structure of 3' end of HIV-1 pre-mRNA 3' untranslated region / V. V. Otenko, M. I. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, I. N. Kolomiets, D. M. Novorun // The 4th Conference of Young Scientists, dedicated to Illya Mechnikov 165th

- Anniversary, Kyiv, Ukraine. Biopolym. Cell. – Vol. 26, N 5. – 2010. – P. 438. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, створення структурної моделі 3'-кінця про-мРНК ВІЛ-1, участь в написанні тез.*
48. Structural models of the complete HIV-1 poly(A) region / A. L. Potyahaylo, M. I. Zarudnaya, I. N. Kolomiets, D. M. Hovorun // 7th annual scientific conference “Bridges in life sciences”, Budapest, Hungary. Biopolym. Cell. – 2012. – Vol. 28, N 2 (supplementary). – P. 187. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, створення структурної моделі комплексного полі(А)-сайту про-мРНК ВІЛ-1, участь в написанні тез.*
49. The role of G-quadruplexes in maintaining of the functional structures of HIV-1 untranslated regions / M. I. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, I. N. Kolomiets, D. M. Hovorun // XI Український біохімічний конгрес, Київ, Україна. Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 5 (Suppl 1). – P. 27–28. *Особистий внесок здобувача – ідея роботи, огляд літератури за темою дослідження, філогенетичний аналіз послідовностей сигнальних елементів геному ВІЛ-1 та передбачення їхньої вторинної структури, участь в написанні тез.*

АНОТАЦІЯ

Зарудна М.І. Структурні переходи в гомополірибонуклеотидах та їхнє біологічне значення. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2015.

Вперше експериментально визначено значення ефективного діаметру подвійної спіралі ДНК за проміжних іонних сил І розчину. Виміри проведено методом осмометрії. Вперше методами електрофорезу та протонної буферної ємності досліджено у залежності від умов середовища структурні переходи в гомополірибонуклеотидах. Підтверджено існування відомих і знайдено нові форми; детально вивчено динаміку структурних переходів. Запропоновано молекулярні механізми утворення двох різних односпіральных і двох різних двохспіральных форм полі(А), «замороженої форми» полі(А) та і-форми полі(С). Представлено та обґрунтовано молекулярні моделі втягнення оліго(А)-дуплексів та G-квадруплексів у низку біологічних процесів. Створено базу даних для 244 полі(А)-сайтів про-мРНК людини. Встановлено, що ~ 35 % про-мРНК містять послідовності, які можуть утворювати G-квадруплекси в ділянці -200/+200 нт, котра охоплює місце розщеплення, а ~ 12 % про-мРНК мають послідовності, здатні формувати і-мотив. Показано, що більшість транскриптів містять допоміжні елементи сайтів поліаденілування (USEs і AuxDSEs). У результаті широкомасштабного філогенетичного дослідження виявлено загальні та специфічні характеристики структурних елементів сайтів димеризації і поліаденілування геному ретровірусу ВІЛ-1.

Ключові слова: гомополінуклеотиди, структурні переходи, електрофорез, протонна буферна ємність, димеризація геному ВІЛ-1, поліаденілування про-мРНК.

АННОТАЦИЯ

Зарудная М.И. Структурные переходы в гомополирибонуклеотидах и их биологическое значение. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2015.

Гомополимерные тракты выполняют функции регуляторных элементов в различных процессах жизненного цикла про-мРНК/мРНК. Однако молекулярные механизмы многих процессов, происходящих с участием этих трактов, выявлены не полностью или вообще неизвестны. Интенсивное исследование синтетических гомополирибонуклеотидов во второй половине XX-го столетия выявило многие особенности их структуры, однако осталось немало спорных и невыясненных вопросов. Поэтому потребовалось дальнейшее комплексное изучение физико-химических свойств этих макромолекул с помощью новых физико-химических методов и подходов для выяснения механизмов важных биологических процессов, протекающих с участием клеточных белков, специфически взаимодействующих с этими макромолекулами.

Поскольку электростатические эффекты во многом определяют стабильность полинуклеотидов, их структуру, реактивность и способность связывать различные лиганды, на первом этапе работы мы провели исследование этих эффектов в полинуклеотидах на примере ДНК с помощью метода осмометрии. ДНК была выбрана для этих целей, поскольку по своей архитектуре гомополимеры, как линейные структуры, ближе к ДНК, чем к длинным природным РНК. Сконструировав осмометр, обладающий достаточно малым временем установления равновесия, мы впервые измерили осмотическое давление ДНК и определили значения эффективного диаметра ее двойной спирали при промежуточных ионных силах (0,01-0,1М) раствора. При уменьшении ионной силы в указанных пределах эффективный диаметр ДНК увеличивается примерно в три раза.

Для исследования структурных переходов в гомополирибонуклеотидах впервые использованы методы аналитического электрофореза и протонной буферной емкости. Методом электрофореза подтверждено существование при кислых рН двух различных двухспиральных форм поли(А), а также его «замороженной» формы. Сделано предположение о том, что эта форма возникает при протонировании поли(А) в результате одновременного образования как межмолекулярных, так и внутримолекулярных двойных спиралей олиго(А). Методом протонной буферной емкости впервые детально исследована динамика образования различных форм поли(А). Показано, что обе формы поли(А) образуются кооперативно, но с различной степенью кооперативности. Порядок появления форм зависит от ионной силы раствора и температуры. Впервые выдвинуто предположение о том, что существование двух различных форм одноцепочечного поли(А) и двух различных двухцепочечных форм этого полимера связано с наличием или отсутствием вертикальных водородных связей ...N6H...N6H...N6H..., образующихся между атомами водорода и азота экзоциклических аминогрупп соседних оснований.

Методом протонной буферной емкости выявлено, что при подкислении раствора поли(С) происходят два различных процесса некооперативного протонирования гомополимера, один из которых снижает термодинамическую стабильность дуплексов поли(С) и приводит к их диссоциации. Методом электрофореза впервые обнаружено наличие двух различных форм протонированного поли(С) – предположительно, двойной спирали и *i*-формы. Предложен механизм образования *i*-формы.

Методом электрофореза выявлено, что при концентрации моновалентных катионов > 10 мМ поли(Г) полностью находится в форме квадруплекса. Впервые получены электронные спектры поглощения толуидинового голубого, связанного с гомополирибонуклеотидами, в агарозных гелях. Показано, что форма спектра зависит как от природы гомополимера, так и от его форм.

Учитывая, что, согласно литературным данным, адениновые основания в поли(А) могут быть протонированы посредством переноса протонов от кислых аминокислотных остатков белков, мы предположили, что двойные спирали поли(А) могут образовываться в клетке. Предложены и обоснованы модели их участия в таких процессах как стабилизация мРНК белками семейства Hu/ELAV, саморегуляция синтеза цитоплазматического поли(А)-связывающего белка, терминация полиаденилирования и др.

Представлены и обоснованы три структурные модели с участием G-квадруплексов. Первая модель относится к процессу димеризации генома ВИЧ-1. Мы предположили, что в зрелых вирионах димер, образованный шпильками DIS, стабилизирован квадруплексами, содержащими как G-тетрады, так и тетрады из смешанных оснований, что обеспечивает контакт между двумя геномами на протяжении синтеза всей минус-цепи провирусной ДНК. Во второй модели G-квадруплекс играет структурную роль в процессе полиаденилирования про-мРНК вируса SV-40, обеспечивая доступность основных сигнальных элементов поли(А)-сайта этой про-мРНК для белкового аппарата полиаденилирования. Третья модель относится к процессу полиаденилирования про-мРНК ВИЧ-1. Предположив, что G-квадруплексы могут выполнять функцию границ независимо сворачивающихся доменов РНК, мы впервые представили модель комплексного поли(А)-сайта про-мРНК ВИЧ-1, а также почти всей 3'-нетранслируемой области транскрипта.

Создана и проанализирована база сайтов полиаденилирования для 244 про-мРНК человека в области $-200/+200$ нт. Установлено, что ~ 35 % про-мРНК содержат в этой области последовательности, способные образовывать G-квадруплексы, а ~ 12 % про-мРНК содержат последовательности, способные образовывать *i*-мотив. Показано также, что большинство транскриптов содержат вспомогательные элементы поли(А)-сайтов (USE и AuxDSE). Комплексные сайты полиаденилирования про-мРНК человека отличаются не только наличием вспомогательных элементов, но и организацией основных сайтов. Фактически каждый поли(А)-сайт является специфическим. Это означает, что процесс терминации транскрипции не менее сложен и важен для регуляции экспрессии генов, чем процесс ее инициации.

Ключевые слова: гомополирибонуклеотиды, структурные переходы, электрофорез, протонная буферная емкость, димеризация генома ВИЧ-1, полиаденилирование про-мРНК.

SUMMARY

Zarudnaya M.I. Structural transitions in homopolyribonucleotides and their biological role. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Science degree in Biology, speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The values of the effective diameter of the DNA double helix have been first determined at the intermediate ionic strength of solution. The measurements were performed by osmometry method. Structural transitions in homopolyribonucleotides have been first investigated by electrophoresis and proton buffer capacity methods. Experiments have supported the existence of the known conformations of these homopolymers and revealed some new conformations. The dynamics of the transitions has been studied in details. The molecular mechanisms of formation of two different single helical and two different double helical conformations of poly(A), “frozen” form of poly(A) and i-form of poly(C) have been proposed. The molecular models of participation of intramolecular oligo(A)-duplexes and G-quadruplexes in some biological processes have been presented. The database of 244 human pre-mRNA fragments covering the poly(A) region -200/+200 nts around the cleavage site has been compiled and searched for G-quadruplexes, i-motifs and other auxiliary elements (USEs and AuxDSEs). About 35% of pre-mRNAs have the potential to form G-quadruplexes and about 12% of pre-mRNAs – to form i-motifs. Besides it has been shown that the most of the transcripts also contain other auxiliary elements. As a result of large-scale phylogenetic analysis, common and specific characteristics of the structural elements of polyadenylation and dimerization sites of the HIV-1 genome have been identified.

Key words: homopolyribonucleotides, structural transitions, electrophoresis, proton buffer capacity, dimerization of retroviruses genomes, pre-mRNA polyadenylation.