

Обнаружение методом электрофореза двух различных форм протонированного поли(С)

М. И. Зарудная, А. В. Степанюгин, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03680, Украина

m.i.zarudna@imbg.org.ua

Впервые методом электрофореза изучены конформационные переходы в поли(С) в зависимости от значения рН раствора. Обнаружено, что при кислых рН в процессе электрофореза наблюдаются две перекрывающиеся зоны полимера, не связанные со специфическим воздействием растворителя на полимер, причем медленнее мигрирующая форма поли(С) не является «замороженной» формой, характерной для поли(А). Быстрее мигрирующая зона протонированного поли(С) отнесена к его двухцепочечной, а медленнее мигрирующая – к четырехцепочечной форме (i-мотиву). Исследована зависимость появления двух зон протонированного поли(С) от ионной силы в интервале концентраций 4–74 мМ. Предложен молекулярный механизм образования i-мотива из дуплексов и одиночных цепей.

Ключевые слова: поли(С), протонирование, конформационные переходы, i-мотив, электрофорез.

Введение. Все гомополимеры и гомоолигомеры канонических рибонуклеотидов являются составными элементами природных РНК и выполняют определенные биологические функции [1]. Участки поли(С) длиной от нескольких десятков до нескольких сотен нуклеотидов содержатся в 5-нетранслируемой области геномов кардиовирусов и вируса ящура из семейства пикорнавирусов [2]. Существующие данные о роли поли(С)-участка в патогенности этих вирусов противоречивы [3–6]. Неясно также, какой именно гомополимер является в действительности функционально значимым – поли(С)-тракт, комплементарный ему поли(Г)-участок в минус цепи РНК вируса, двухцепочечный тракт поли(Г)поли(С), образующийся как промежуточное соединение в процессе синтеза минус

цепи, или же все эти участки. Поли(Г)поли(С), как известно, является одним из наилучших субстратов для протеинкиназы, активируемой двухцепочечными РНК [7].

Следует также отметить, что хозяйский поли(С)-связывающий белок (РСВР), специфически взаимодействующий с пиримидин-богатыми мотивами РНК [8, 9], связывается с внутренним сайтом посадки рибосом на геномной РНК вируса ящура, однако роль такого взаимодействия неясна [10, 11]. Кроме того, предполагается, что РСВР участвует во взаимодействии между 5- и 3-концами генома этого же вируса [12]. Непонятно, какую роль во взаимодействии между РСВР и геномной РНК вируса ящура играет поли(С)-участок, способный прочно связываться с РСВР [9] и конкурентно блокировать, в свою очередь, связывание этого белка с клеточными и вирусными РНК [13].

Хотя в большинстве известных случаев места связывания для клеточных РСВР являются пиримидин-богатые участки РНК, олиго(С)-тракты также найдены в числе таких мест. Олиго(С)-тракт длиной 14 нуклеотидов, являющийся цитоплазматическим элементом полиаденилирования мРНК рр2АС лягушки, специфически связывается с белком, гомологичным РВСП-2 человека [14].

Определенные биологические функции могут выполнять не только поли(С)-участки в РНК или одиночные олиго(С)-тракты, но и кластеры олиго(С)-трактов. В 1993 году была открыта новая структура ДНК, получившая название *i*-мотив [15]. В этой структуре два дуплекса, состоящие из параллельно ориентированных протонированных олиго(dС)-трактов со спаренными основаниями, связаны между собой таким образом, что их пары оснований полностью интеркалированы, а сами дуплексы ориентированы антипараллельно. *i*-Мотив образуется не только из четырех отдельных цепей, в такую структуру могут сворачиваться и одноцепочечные участки протонированной ДНК, содержащие кластеры олиго(dС)-трактов [16]. Позднее показано, что РНК тоже может образовывать *i*-мотив [17].

Ранее нами обнаружено, что кластеры олиго(С)-трактов, способные сворачиваться в *i*-мотив, нередко встречаются вблизи сигналов полиаденилирования про-мРНК животных. Мы предположили, что они могут играть роль дополнительных элементов сигналов полиаденилирования [18].

В связи с открытием *i*-мотива возник вопрос о том, с какой же структурой имели дело исследователи, изучающие конформационные переходы в поли(С), до выявления этого мотива: являлся ли протонированный поли(С) дуплексом, *i*-мотивом или еще какой-либо структурой [16]? Обзор литературы, посвященный конформационным переходам в поли(С) при протонировании его оснований, приведен в работе [19], где мы исследовали их методом протонной буферной емкости. При щелочных и нейтральных рН поли(С) представляет собой одноцепочечную структуру, состоящую из спиральных и разупорядоченных участков. В случае подкисления раствора происходит высококооперативный переход полимера в другую форму (как

считалось ранее, в двойную спираль), pK которого зависит от ионной силы (I). При степени протонирования полимера $\sim 70\%$ двойная спираль распадается с образованием протонированных одиночных цепей. Нами предложен и обоснован новый механизм этого распада [19–21].

Исследования конформационных переходов в поли(С) методом протонной буферной емкости [19–20] не позволяют сделать вывод о том, в какой конформации (двойная спираль, *i*-мотив или одновременно обе эти формы) находится протонированный полимер. Причина, по-видимому, состоит в том, что протонирование ведет к образованию тех же самых CytCyt⁺ пар оснований как в случае *i*-мотива, так и двойной спирали поли(С).

В недавней работе [22] конформационные переходы в поли(С) изучали методом колебательного кругового дихроизма. Авторы показали, что полоса ИК-поглощения $\sim 1693\text{ см}^{-1}$ является маркером двуспиральной формы поли(С). Они не исключают также, что эта полоса относится к *i*-мотиву, но считают такой вариант менее вероятным, в частности, из-за того, что в литературе нет каких-либо доказательств существования *i*-мотива поли(С).

Мы впервые применили для исследования гомополимеров метод электрофореза [23–25] и, в частности, зарегистрировали этим методом все известные в литературе формы поли(А) – одноцепочечную, две двухцепочечные и «замороженную». При изучении этим методом поли(С) при кислых рН наблюдаются две зоны, одну из которых можно отнести к двуспиральной форме полимера, но природа второй зоны была нам непонятна и результаты не были опубликованы. Заметим, что эти эксперименты проводили до открытия *i*-мотива ДНК. Настоящая работа посвящена исследованию второй формы протонированного поли(С), регистрируемой методом электрофореза.

Материалы и методы. Использованы препараты поли(С) фирмы «Reanal» (Венгрия) и «Calbiochem» (США), поли(А) фирмы «Calbiochem» и агароза фирмы «BioRad» (США).

Электрофорез проводили в течение 80–140 мин при комнатной температуре в трубках диаметром 0,6 см в электрофоретической камере ОЕ-110 (Венгрия) при напряжении 60 В.

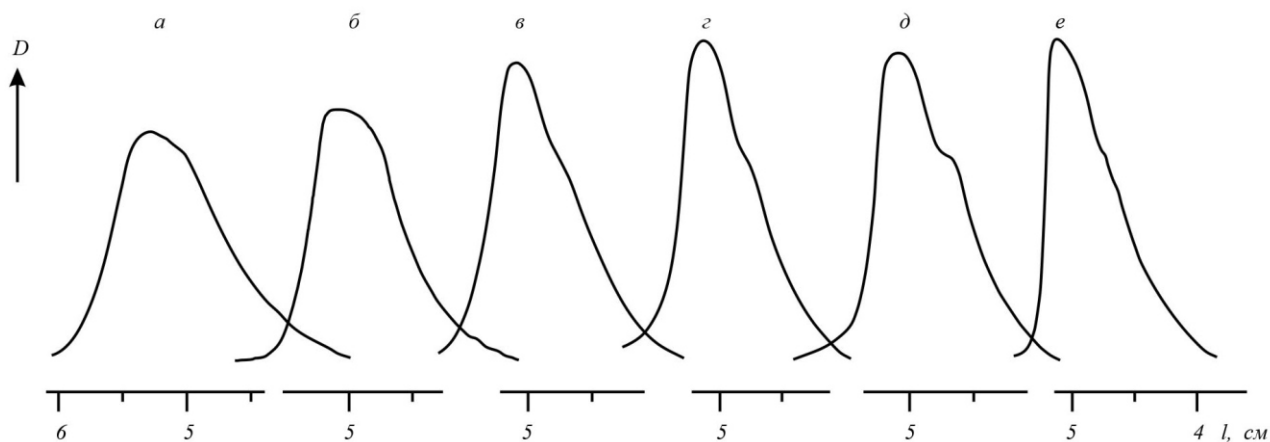


Рис. 1. Денситограммы поли(С) при разных значениях рН в трис-ацетатном буфере ($I = 13-14$ мМ, 0,8 %-я агароза, время электрофореза (t) 85 мин): а – рН 7,7; б – рН 6,7; в – рН 6,0; г – рН 5,6; д – рН 5,2; е – рН 4,9

Эксперименты в трис-ацетатном буфере выполнены с использованием такого варианта электрофореза [25], при котором в буфер помещали трубки с агарозными гелями, приготовленными в разных растворах. Эксперименты в трис-фосфатном буфере проведены традиционным способом, когда агарозу готовили в таком же растворе, что и буфер для электрофореза.

Буферные растворы для электрофореза в трис-ацетатном буфере содержали трис (от 3 до 10 мМ), уксусную кислоту, с помощью которой изменяли рН растворов, и динатриевую соль ЭДТА (от 0,3 до 1 мМ). Агарозу готовили в растворах, содержащих трис и ЭДТА в тех же концентрациях, что и в электродных буферных растворах, в экспериментах при I от 4 до 14 мМ и 25 мМ трис в экспериментах при $I \sim 26$ мМ.

В трис-фосфатный буфер для электрофореза вносили трис (от 5 до 70 мМ), фосфорную кислоту, с помощью которой изменяли рН растворов, и 1 мМ динатриевую соль ЭДТА. Агарозу готовили в тех же буферах, в которых проводили электрофорез.

Ионную силу растворов рассчитывали по формуле: $I = \sum c_i Z_i^2 / 2$, где c_i – концентрация; Z_i – валентность присутствующего в растворе i -го иона. Ее повышали, увеличивая концентрацию трис-ацетатного или трис-фосфатного буфера.

Гели окрашивали на протяжении 1 ч 0,01 %-м раствором толуидинового голубого при рН 7,6–7,8 в 10 мМ трис-НСl буфере. Окрашенные и отмытые

от красителя гели сканировали на приборе Хромоскан-200 (Англия).

Результаты и обсуждение. Электрофорез поли(С) в трис-ацетатном буфере. На рис. 1 приведены данные электрофореза поли(С) при разных значениях рН и ионной силе 13–14 мМ, являющиеся результатом одного эксперимента, т. е. составы растворителей в трубках с агарозными гелями были различными (см. «Материалы и методы»). Как показано в нашей работе [25], результаты такого варианта электрофореза не отличаются от полученных стандартным способом.

Как следует из данных потенциометрического титрования (не показано), рК перехода поли(С) из одноцепочечной спирали в двухцепочечную при $I = 14$ мМ составляет 6,10, что согласуется с литературными данными, суммированными на рис. 3 в работе [19]. Из рис. 1 видно, что при рН выше рК перехода наблюдается одна зона поли(С) (рис. 1, а, б). При более низких рН наблюдаются две перекрывающиеся зоны, причем денситограммы, показанные на рис. 1, г–е, относятся к той области рН, где переход в двойную спираль уже завершен, а распад дуплексов еще не начался. Из рис. 1 следует, что обе кислые формы поли(С) одновременно присутствуют в растворе при всех значениях рН ниже рК перехода и с уменьшением величины рН их относительное количество значительно не изменяется.

Важно отметить, что в эксперименте, результаты которого представлены на рис. 1, на гели, приготовленные при разных значениях рН, наносили по-

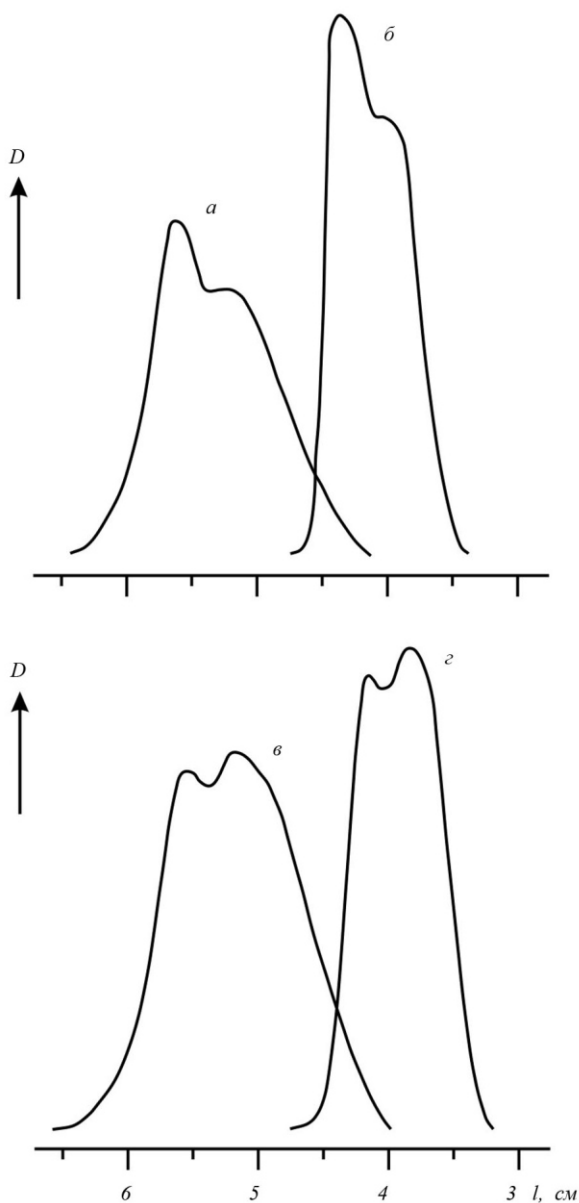


Рис. 2. Денситограммы поли(С) при разных ионных силах в трис-ацетатном буфере (рН ~5,5; 0,8 %-я агароза, $t = 112$ мин): *a, в* – $I = 6,7$ мМ, *б, г* – $I = 25,9$ мМ; *a, б, г* – образец приготовлен при рН 7,5; *в* – образец приготовлен при рН 5,5; *г* – образец прогрет

ли(С), растворенный при рН 7,6, т. е. конформационные переходы полимера из нейтральной формы в кислую происходили непосредственно при вхождении образца в агарозный гель. Если же поли(С) растворяли в кислых растворах и в них же проводили электрофорез, то относительное количество медленнее мигрирующей формы увеличивалось, как это видно из сравнения кривых *a* и *в* (рис. 2), где

приведены результаты экспериментов, в которых на гель, приготовленный при $I = 6,7$ мМ и рН 5,5, наносили либо слабощелочной (рис. 2, *a*), либо кислый раствор поли(С) (рис. 2, *в*).

Еще одним способом увеличения относительного количества медленнее мигрирующей формы в случае образца, растворенного в слабощелочной среде, является его перевод в кислый раствор и кратковременный (10 мин) прогрев при температуре 75–80 °С непосредственно перед электрофорезом. Денситограммы непрогретого и прогретого образцов поли(С) при $I = 25,9$ мМ и рН 5,5 показаны как пример на рис. 2, *б* и *г* соответственно.

На рис. 2, *a*; *1, г* и *2, б*, приведены денситограммы поли(С) при одном и том же значении рН (~5,5) и при разных ионных силах – 6,7; 14,0 и 25,9 мМ соответственно. Две перекрывающиеся зоны наблюдаются во всех этих экспериментах.

Является ли медленнее мигрирующая форма протонированного поли(С) «замороженной» формой? Как следует из вышеизложенного, при рН ниже рК перехода из нейтральной формы в кислую наблюдаются две зоны поли(С). Какова же их природа? Учитывая тот факт, что короткие олигорибонуклеотиды – $r(UC_5)$, $r(C_5)$, $r(C_5U)$ и др. способны образовывать *i*-мотив [17], можно предположить, что протонированный поли(С) тоже может находиться в этой конформации, и при электрофорезе при кислых рН наблюдаются две формы полимера – двух- и четырехцепочечная.

Однако прежде чем делать такое заключение, следует рассмотреть и другие возможные причины регистрации методом электрофореза двух протонированных форм поли(С). Следует отметить, что появление второй формы не является специфической особенностью какого-либо препарата поли(С), поскольку две зоны при кислых рН наблюдались с препаратами разных фирм («Reanal», «Calbiochem», «Serva» и др).

Медленнее мигрирующая зона протонированного поли(С) могла бы относиться к так называемой «замороженной» форме полимера. Такая форма известна для поли(А). Она легко образуется, когда препарат поли(А) непосредственно помещают в кислый раствор [24, 26]. Наилучшим способом предотвращения образования «замороженной»

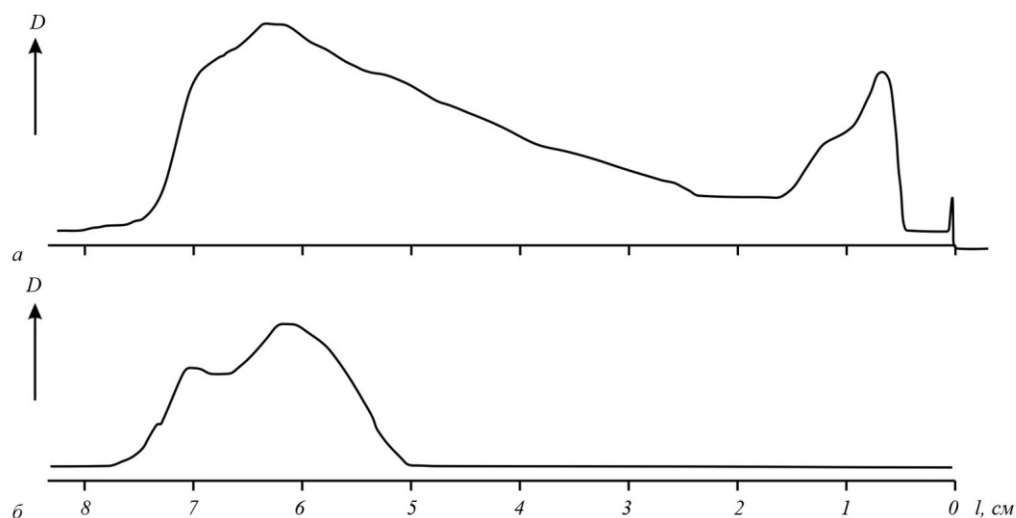


Рис. 3. Денситограммы поли(А) в трис-ацетатном буфере ($I = 8,3$ мМ, рН 5,5; 0,8 %-я агароза): а – препарат приготовлен при рН 5,5 ($t = 136$ мин); б – препарат приготовлен при рН 7,5 ($t = 120$ мин)

формы поли(А) является диализ образца, растворенного при слабощелочном рН, против кислого растворителя [26]. Хороший результат наблюдается также при кратковременном прогреве кислого раствора поли(А) или, как показано нами [24], при нанесении слабощелочного раствора поли(А) на кислые гели.

На рис. 3 представлены денситограммы препаратов поли(А) фирмы «Calbiochem», растворенных при рН 5,5 (рис. 3, а) и 7,5 (рис. 3, б) и нанесенных на гели, приготовленные при рН 5,5. При кислых рН поли(А), как и поли(С), претерпевает конформационные изменения [1], переходя из одноцепочечной в две разные двухцепочечные формы (рис. 3, б), и если не предпринять специальных мер, – то и в «замороженную» форму (рис. 3, а). При этом во время электрофореза наблюдается размытая зона, соответствующая агрегатам разных размеров.

Мы предположили [27], что «замороженная» форма поли(А) возникает при его протонировании вследствие одновременного образования двухцепочечных фрагментов как между участками одной и той же молекулы (при сворачивании ее «самой на себя»), так и между этой молекулой и другими, что приводит к образованию зародыша агрегата. Для сворачивания «самых на себя» молекулы полимера должны быть в достаточной степени гибкими. Действительно, мы нашли, что количество «замороженной» формы поли(А) повышается с возрастанием гибкости макромолекул, т. е. с увеличением их длины и ионной силы растворителя [28].

Основываясь на вышеизложенном образование второй формы поли(С) при протонировании полимера нельзя связать с «замороженной» формой. Во-первых, две формы поли(С) существуют в условиях, в значительной мере препятствующих образованию «замороженной» формы поли(А), – при прогреве или нанесении слабощелочного образца на кислый гель. Во-вторых, в наших экспериментах мы не наблюдали при электрофорезе поли(С), растворенного в кислой среде, размытых зон, аналогичных зонам «замороженной» формы поли(А). Важно отметить, что если в случае образцов поли(А) фирмы «Reanal» с относительно короткими по длине макромолекулами (коэффициент седиментации 4,6–5,6S) размытые зоны уже явно видны при $I = 20$ мМ, то в случае образцов поли(С) этой же фирмы (коэффициент седиментации 4S) размытых зон не наблюдали и при самой высокой ионной силе (74 мМ), при которой проводили электрофорез.

Возможно, в одном из экспериментов мы наблюдали «замороженную» форму поли(С), когда препарат фирмы «Calbiochem» был приготовлен в кислом растворе при $I = 40$ мМ. Коэффициент седиментации этого препарата не указан, но его электрофоретическая подвижность близка по величине к таковой препарата поли(С) фирмы «Serva» с коэффициентом седиментации 8–13S. При электрофорезе препарата фирмы «Calbiochem» отмечено небольшое уширение медленнее мигрирующей зоны полимера, исчезающее в случае предварительного прогрева образца или же когда образец сначала

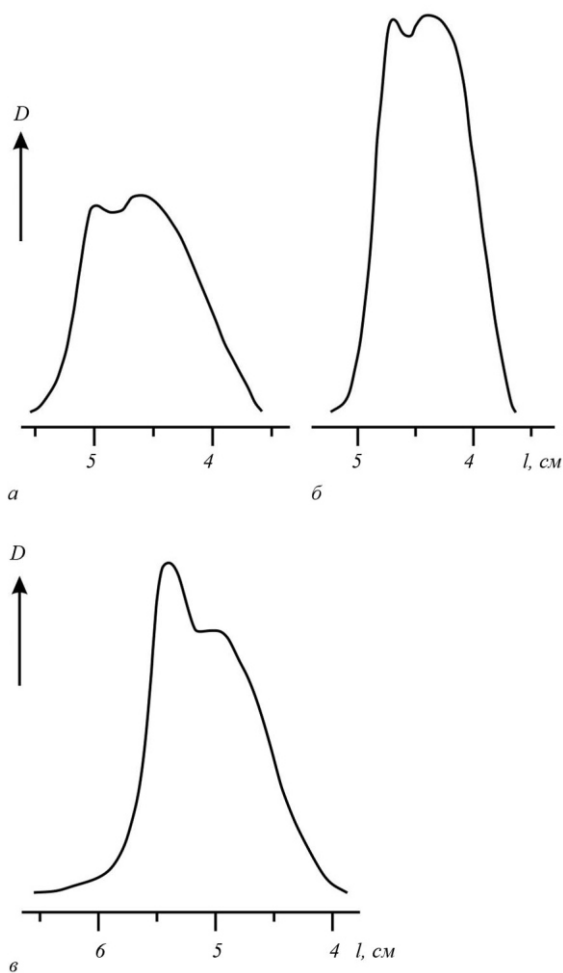


Рис. 4. Денситограммы поли(С) в трис-фосфатном буфере (а, б) и NaH_2PO_4 (в) (0,8 %-я агароза): а – $I = 8,5$ мМ, рН 5,3, $t = 83$ мин; б – $I = 44,2$ мМ, рН 5,3, $t = 92$ мин; в – 7 мМ NaH_2PO_4 , рН 4,8, $t = 94$ мин

ла растворяли в кислой среде при $I = 10$ мМ, а затем переводили в условия более высокой ионной силы.

Таким образом, хотя мы и не можем однозначно утверждать, что поли(С) не способен образовывать «замороженную» форму ни при каких условиях, тем не менее, наличие двух перекрывающихся зон при электрофорезе поли(С) в кислой среде не связано с этой формой. Неэффективное образование «замороженной» формы в случае поли(С) может быть, в частности, обусловлено тем, что макромолекулы этого полимера более жесткие, чем макромолекулы поли(А) [29].

Следует, однако, отметить, что в некоторых случаях при длительном хранении кислых растворов поли(С) полимер начинает выпадать в осадок.

Электрофорез поли(С) в фосфатном буфере. Описанные выше электрофоретические эксперименты проводили в трис-ацетатных буферных растворах. При кислых рН часть молекул уксусной кислоты, входящей в состав этих растворов, содержит недиссоциированные (нейтральные) карбоксильные группы. Согласно литературным данным [30, 31], нейтральная карбоксильная группа способна стабильно связываться с цитозином и цитидином и может конкурировать с гуанином за образование Н-связей с цитозином. Необходимо отметить, что водородные связи в паре CytCyt^+ подобны таковым в паре CytGua [20].

С учетом изложенного выше нужно было ответить на вопрос – не препятствует ли недиссоциированная уксусная кислота образованию двойной спирали поли(С) и не относится ли медленнее мигрирующая зона этого полимера к его одноцепочечной форме? Для этого мы провели электрофорез поли(С) в трис-фосфатном буфере при разных рН и ионных силах. На рис. 4 приведены денситограммы поли(С) при рН 5,3 и разных значениях ионной силы: 8,5 (рис. 4, а) и 44,2 мМ (рис. 4, б). Как следует из рис. 4, в фосфатном буфере, так же как и в ацетатном, при электрофорезе протонированного поли(С) наблюдаются две перекрывающиеся зоны. Две зоны отмечаются и при более высокой ионной силе (74 мМ) (не показано).

Более того, две зоны регистрируются и в том случае, когда электрофорез проведен в отсутствие трис и ЭДТА. На рис. 4, в, приведена денситограмма поли(С) в 7 мМ NaH_2PO_4 (рН 4,8).

Важно заметить, что разделение на зоны других гомополирибонуклеотидов также не зависит от того, в каком буфере – ацетатном или фосфатном – проводили электрофорез. Однако подвижность полирибонуклеотидов в фосфатном буфере выше, чем в ацетатном. Например, в экспериментах, представленных на рис. 2, б и 4, б, узкая зона поли(С) мигрировала на расстояние, равное примерно половине длины трубки с агарозой, на 20 мин быстрее в фосфатном буфере, чем в ацетатном.

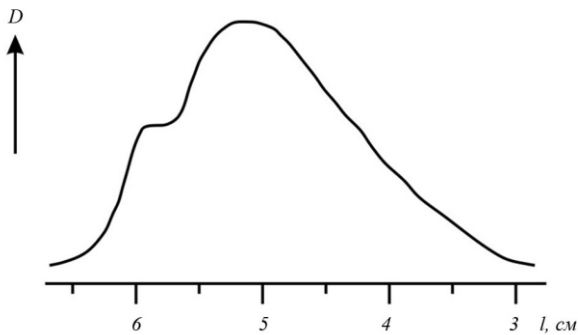


Рис. 5. Денситограмма поли(С) фирмы «Calbiochem» в трис-фосфатном буфере ($I = 8,5$ мМ, $\text{pH } 5,3$, $t = 103$ мин)

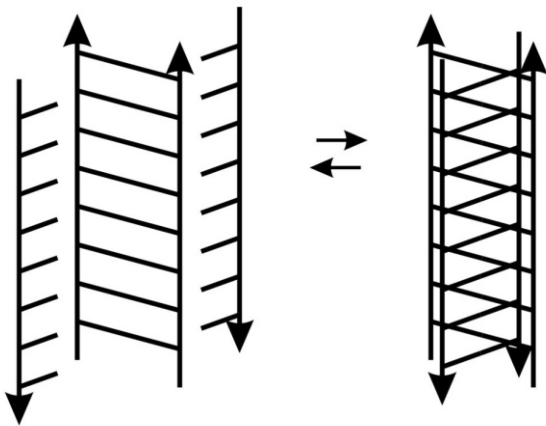


Рис. 6. Схема образования *i*-формы поли(С)

Таким образом, регистрация методом электрофореза двух кислых форм поли(С) не обусловлена специфическим влиянием компонентов электрофоретического буфера на полимер.

Выводы. Длительное время считалось, что при протонировании одноцепочечного поли(С) образуется двойная спираль, содержащая пары оснований CytCyt^+ . С открытием *i*-мотива ДНК возник вопрос, действительно ли эти пары находятся в составе дуплекса или же входят в состав четырехцепочечной структуры – *i*-мотива РНК? Ответ на него не удалось получить, используя многие физико-химические методы исследования биополимеров, в частности, спектроскопические и метод потенциометрического титрования [17, 20].

Проведенное нами изучение конформационных переходов в поли(С) методом электрофореза выявило, что в интервале pH между двумя pK переходов, первый из которых соответствует (как думали

раньше) образованию двойной спирали поли(С), а второй – ее распаду, поли(С) сосуществует в двух формах. Контрольные эксперименты показали, что появление двух форм не является особенностью какого-либо препарата поли(С), оно не обусловлено специфическим действием растворителя и медленнее мигрирующая форма не является «замороженной» формой, подобной той, которую легко образует поли(А) в кислых растворах.

Полученные результаты позволяют с уверенностью предположить, что регистрируемые методом электрофореза протонированные формы поли(С) относятся к двуспиральной форме полимера и *i*-мотиву. При этом дуплексу соответствует быстрее мигрирующая, а квадруплексу – медленнее мигрирующая форма. Дуплексы поли(С) имеют меньшие размеры и являются более гибкими, чем квадруплексы, и вследствие этого хуже разделяются по размеру в гелях агарозы: им соответствуют узкие (быстрее мигрирующие) зоны, тогда как более объемным и жестким четырехцепочечным структурам отвечают широкие зоны. Этот эффект заметнее выражен в случае препаратов поли(С), являющихся более высокомолекулярными, чем препараты фирмы «Reanal», таких например, как препараты фирмы «Calbiochem» (рис. 5).

Учитывая тот факт, что при всех значениях pH ниже pK первого конформационного перехода в растворе присутствуют обе кислые формы поли(С), мы предположили, что *i*-форма, скорее всего, образуется лишь в том интервале pH , когда в растворе одновременно присутствуют как одно-, так и двухцепочечные молекулы полимера, т. е. во время перехода поли(С) из нейтральной в кислую форму. Предлагаемая нами схема образования квадруплекса представлена на рис. 6. Согласно этому механизму, при наличии затравочного количества дуплексов последующие дуплексы формируются непосредственно на них; основания одиночных цепей интеркалируют между парами оснований уже имеющейся двойной спирали, приводя к образованию новых пар и четырехцепочечной структуры.

Небольшие различия между *a* и *b* (рис. 2), а также *b* и *c* (рис. 2), на которых представлены денситограммы образцов поли(С), приготовленных различными способами, можно, по-видимому, объяс-

нить тем, що при подкисленні полі(С) переходною станом, в якому одночасно існують і одноцепочечна, і двучепочечна форми полімера, триває менше коротке час при електроміграції слабощелочного розчину полі(С) в кислий гель (рис. 2, а, 2, б), ніж в разі приготування препарату в кислому середі (рис. 2, в) або повільному охолодженні розтопленого зразка (рис. 2, г), в час якого відбувається реасоціація розплавлених дуплексів і квадруплексів.

Автори висловлюють вдячність Н. В. Литовченко за технічну допомогу.

M. I. Zarudnaya, A. V. Stepanyugin, A. L. Potyahaylo, D. M. Hovorun

Detection of two different protonated forms of poly(C) by electrophoresis method

Summary

Conformational transitions in poly(C) as a function of pH have been first studied by the method of electrophoresis. It was found that the polymer migrates by two overlapping bands at acidic pH. Occurrence of two overlapping bands was not due to specific action of the solvent and the band with lower electrophoretic mobility did not correspond to «frozen» form of the polymer, similar to that of poly(A). It was proposed that the band with higher electrophoretic mobility corresponds to double helical form and with lower electrophoretic mobility corresponds to four-stranded i-motif. The dependence of occurrence of two zones of protonated poly(C) on ionic strength was studied in the range of concentrations 4–74 mM. The scheme of i-motif formation from duplexes and single strands has been suggested.

Keywords: poly(C), protonation, conformational transitions, i-motif, electrophoresis.

M. I. Zarudna, A. V. Stepanyugin, A. L. Potyahaylo, D. M. Hovorun

Регістрація двох різних форм протонованого полі(С) методом електрофорезу

Резюме

Вперше методом електрофорезу вивчено конформаційні переходи в полі(С) залежно від значення рН розчину. Виявлено, що при кислому рН у процесі електрофорезу спостерігаються дві зони полімеру, які перекриваються. Вони не зумовлені специфічною дією розчинника, а повільніше мігруюча зона не відповідає «замороженій» формі, характерній для полі(А). Швидше мігруючу зону протонованого полі(С) віднесено до дволанцюгової форми, а повільніше мігруючу – до чотириланцюгової. Залежність появи двох форм протонованого полі(С) від іонної сили розчину досліджено в інтервалі концентрацій 4–74 мМ. Наведено схему формування і-форми полі(С) з дуплексів та поодиноких ланцюгів.

Ключові слова: полі(С), протонування, конформаційні переходи, і-форма, електрофорез.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Zarudnaya M. I., Hovorun D. H.* Самоасоціати гомополімерних трактів клітинних РНК: фізичні механізми утворення і функціонування // *Фізика живої.*–1999.–7, № 2.–С. 38–52.
- Black D. N., Stephenson P., Rowlands D. J., Brown F. J.* Sequence and location of the poly C tract in aphtho- and cardiovascular RNA // *Nucl. Acids Res.*–1979.–6.–Р. 2381–2390.
- Zimmermann A., Botta A., Arnold G., Eggers H. J., Nelsen-Salz B.* The poly(C) region affects progression of encephalomyocarditis virus infection in Langerhans' islets but not in the myocardium // *J. Virol.*–1997.–71.–Р. 4145–4149.
- Orosio J. E., Grossberg S. E., Palmenberg A. C.* Characterization of genetically engineered mengoviruses in mice // *Viral Immunol.*–2000.–13.–Р. 27–35.
- Martin L. R., Neal Z. C., McBride M. S., Palmenberg A. C.* Mengovirus and encephalomyocarditis virus poly(C) tract lengths can affect virus growth in murine cell culture // *J. Virol.*–2000.–74.–Р. 3074–3081.
- LaRue R., Myers S., Brewer L., Shaw D. P., Brown C., Seal B. S., Njenga M. K.* A wild-type porcine encephalomyocarditis virus containing a short poly(C) tract is pathogenic to mice, pigs, and cynomolgus macaques // *J. Virol.*–2003.–77.–Р. 9136–9146.
- Minks M. A., West D. K., Benveniste S., Baglioni C.* Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2, 5 -oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells // *J. Biol. Chem.*–1979.–254.–Р. 10180–10183.
- Ostareck-Lederer A., Ostareck D. H., Hentze M. W.* Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2 // *TIBS.*–1998.–23.–Р. 409–411.
- Makeyev A. V., Liebhaber S. A.* The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms // *RNA.*–2002.–8.–Р. 265–278.
- Walter B. L., Nguyen J. H., Ehrenfeld E., Semler B. L.* Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements // *RNA.*–1999.–5.–Р. 1570–1585.
- Stassinopoulos I. A., Belsham G. J.* A novel protein-RNA binding assay: functional interactions of the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site with cellular proteins // *RNA.*–2001.–7.–Р. 114–122.
- Serrano P., Pulido M. R., Saiz M., Martinez-Salas E.* The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region // *J. Gen. Virol.*–2006.–87.–Р. 3013–3022.
- Murray K. E., Roberts A. W., Barton D. J.* Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability // *RNA.*–2001.–7.–Р. 1126–1141.
- Paillard L., Maniey D., Lachaume P., Legagneux V., Osborne H. B.* Identification of a C-rich element as a novel cytoplasmic polyadenylation element in *Xenopus* embryos // *Mech. Develop.*–2000.–93.–Р. 117–125.
- Gehring K., Leroy J.-L., Gueron M.* A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs // *Nature.*–1993.–363.–Р. 561–565.
- Gueron M., Leroy J.-L.* The i-motif in nucleic acids // *Curr. Opin. Struct. Biol.*–2000.–10.–Р. 326–331.

17. *Snoussi K., Nonin-Lecomte S., Leroy J.-L.* The RNA *i*-motif // *J. Mol. Biol.*—2001.—**309**.—Р. 139–153.
18. *Zarudnaya M. I., Potyahaylo A. L., Kolomiets I. M., Hovorun D. M.* Auxiliary elements of mammalian pre-mRNAs polyadenylation signals // *Биополимери і клітина.*—2002.—**18**, № 6.—С. 500–517.
19. *Зарудная М. И., Потягайло А. Л., Говорун Д. Н.* Конформационные переходы поли(С) и поли(дС): исследование методом протонной буферной емкости // *Биополимеры и клетка.*—2000.—**16**, № 6.—С. 495–504.
20. *Zarudnaya M. I., Samijlenko S. P., Potyahaylo A. L., Hovorun D. M.* Structural transitions in polycytidylic acid: proton buffer capacity data // *Nucleosides, Nucleotides and Nucl. Acids.*—2002.—**21**.—Р. 125–137.
21. *Потягайло А. Л., Зарудна М. І., Говорун Д. М.* Молекулярні механізми структурних переходів полі(С) і полі(дС), спричинених протонуванням, та їхнє квантово-хімічне обґрунтування // *Доповіді НАН України.*—2003.—№ 2.—С. 196–199.
22. *Petrovic A. G., Polavarapu P. L.* Structural transitions in polyribocytidylic acid induced by changes in pH and temperature: vibrational circular dichroism study in solution and film states // *J. Phys. Chem.*—2006.—**110**.—Р. 22826–22833.
23. *Зарудная М. И., Желтовский Н. В.* Определение констант связывания гомополирибонуклеотидов с производным лизина методом электрофореза в агарозных гелях // *Молекуляр. биология.*—1989.—**23**, № 1.—С. 215–224.
24. *Зарудная М. И., Желтовский Н. В.* Исследование взаимодействия гомополирибонуклеотидов с дикатионом эфира лизина методом аффинного электрофореза // *Молекуляр. биология.*—1992.—**26**, № 1.—С. 110–117.
25. *Зарудная М. И., Желтовский Н. В.* Электрофоретическое исследование конформационных переходов в поли(А) при кислых рН // *Молекуляр. биология.*—1995.—**29**, № 5.—С. 1040–1047.
26. *Janik B., Sommer R. G., Bobst A. M.* Polarography of polynucleotides. II. Conformations of poly(adenylic acid) at acidic pH // *Biochim. et biophys. acta.*—1972.—**281**.—Р. 152–168.
27. *Зарудна М. І., Говорун Д. М.* Структурні переходи в поліаденилової кислоти. Можливі молекулярні механізми функціонування полі(А)-хвостів мРНК // *Доповіді НАН України.*—1998.—№ 12.—С. 155–160.
28. *Зарудная М. И., Степанюгин А. В., Потягайло А. Л., Говорун Д. Н.* Исследование конформационных переходов в гомополирибонуклеотидах методом электрофореза // *IV з'їзд Укр. біофіз. тов-ва: Тези доповідей.*—Донецьк, 2006.—С. 295–296.
29. *Rifkind J. M., Shin Y. A., Heim J. M., Eichhorn G. L.* Cooperative disordering of single-stranded polynucleotides through copper crosslinking // *Biopolymers.*—1976.—**15**.—Р. 1879–1902.
30. *Samijlenko S. P., Kolomiets I. M., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V.* Model considerations on physico-chemical nature of protein-nucleic acid contacts through amino acid carboxylic groups: spectroscopic data // *Биополимеры и клетка.*—1998.—**14**, № 1.—С. 47–53.
31. *Кондратюк І. В., Коломієць І. Н., Самойленко С. А., Желтовский Н. В.* Изучение комплексов цитозина с карбоксильной группой аминокислот методом спектроскопии ЯМР // *Биополимеры и клетка.*—1989.—**5**, № 6.—С. 21–25.

УДК 577.323.7

Надійшла до редакції 01.06.07