

ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫЕ СПИРАЛИ ПОЛИАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ ВОЗМОЖНОЕ БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

М. И. ЗАРУДНАЯ, А. В. СТЕПАНЮГИН, А. Л. ПОТЯГАЙЛО, Д. Н. ГОВОРУН

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: m.i.zarudna@imbg.org.ua*

При протонировании одноцепочечной полиадениловой кислоты одновременно с образованием двух двухцепочечных форм полимера образуется и так называемая «замороженная» форма. В данной работе методом электрофореза показано, что количество ее возрастает с увеличением длины поли(А) и ионной силы раствора, то есть с увеличением гибкости полимерной цепи. Эти результаты свидетельствуют в пользу высказанного нами ранее предположения о способности поли(А) сворачиваться с образованием внутримолекулярных двухцепочечных спиралей. Десять лет тому назад мы выдвинули гипотезу, согласно которой внутримолекулярные дуплексы могут образовываться также в поли(А)-трактах клеточных РНК и участвовать в ряде биологических процессов. Анализ появившихся с тех пор данных литературы свидетельствует об адекватности гипотезы и показывает, что она не потеряла своей актуальности в настоящее время.

Ключевые слова: полиадениловая кислота, электрофорез, «замороженная» форма полиадениловой кислоты, внутримолекулярные двойные спирали, терминация полиаденилирования, саморегуляция синтеза поли(А)-связывающего белка (РАВРС), стабилизация мРНК.

Полиадениловая кислота, поли(А), существует в нескольких формах [1–7]. Конформационные переходы между ними обусловлены протонированием и депротонированием полимера. При слабощелочных и нейтральных рН поли(А) представляет собой одноцепочечную спираль с частичным стэкингом оснований. При подкислении раствора она переходит в две различные двухцепочечные спирали, в одной из которых основания образуют водородные связи не только между собой, но и с фосфатными группами противоположной цепи. Одновременно с двухцепочечными спиралями образуется и так называемая «замороженная» форма. При дальнейшем подкислении (рН < 5,0) раствора поли(А) образуется гель.

Название «замороженная» форма предложено В. Janik et al. [3], изучавших конформационные переходы поли(А) методом полярографии. Авторы сделали вывод о том, что при быстром подкислении нейтрального раствора полимера образуется структура, состоящая из неспаренных цепей и беспорядочно распределенных коротких двуспиральных участков, которая посредством термического отжига может быть превращена в упорядоченную двойную спираль. Кроме того, образование этой фор-

мы может быть предотвращено путем диализа нейтрального раствора полимера против кислого буфера. Позднее выводы, сделанные в этой работе, были оспорены другими авторами [8], также изучавшими поли(А) полярографическим методом, в частности было высказано предположение, что отжиг приводит главным образом к образованию агрегатов.

Методом электрофореза мы установили [5], что при непосредственном растворении препаратов поли(А) в кислой среде или при подкислении нейтральных растворов полимера образуются агрегаты разных размеров, в том числе и такие, которые не способны проникнуть в агарозный гель. Однако термический отжиг кислых растворов поли(А) или нанесение на кислые гели нейтральных растворов полимера предотвращает образование агрегатов.

Мы предположили [9], что агрегация поли(А) при ее протонировании является следствием одновременного образования двухцепочечных фрагментов как между участками одной и той же молекулы (при ее сворачивании), так и между этой молекулой и соседними, что приводит к образованию «зародыша» агрегата (рис. 1, а). Поскольку цепи в двойной спирали поли(А) ориентированы параллельно, то для образования внутримолекулярных дуп-

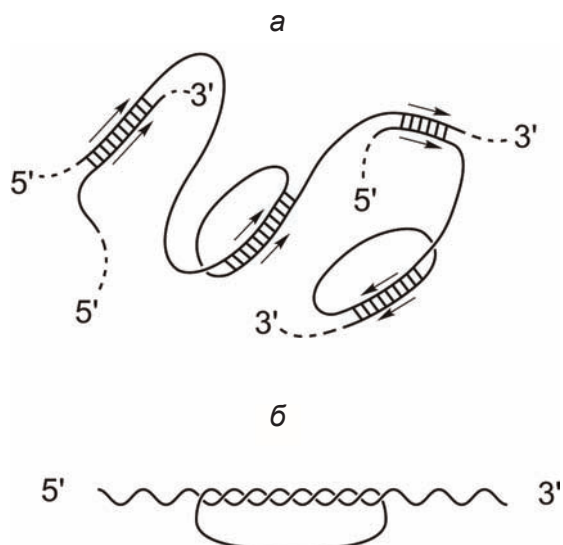


Рис. 1. Схемы образования «замороженной» формы поли(А) (а) и внутримолекулярной двойной спирали олиго(А) (б)

лексов полимер должен сворачиваться в некую трехцепочечную структуру, состоящую из двойной спирали и одиночной цепи (рис. 1, б).

Мы оставили название «замороженная» форма для агрегатов, образующихся при протонировании поли(А), так как в соответствии с определением В. Janik et al. [3] и предложенной нами моделью (рис. 1, а) отдельные участки макромолекул в этой структуре остаются («заморажаются») в одноцепочечной форме в условиях, когда конформационный переход полимера из одноцепочечной спирали в двухцепочечную уже произошел. Беспорядочно образовавшиеся короткие внутримолекулярные дуплексы препятствуют образованию упорядоченных межмолекулярных двойных спиралей.

Предположение о способности поли(А) сворачиваться с образованием внутримолекулярных дуплексов было высказано нами для того, чтобы объяснить механизм появления «замороженной» формы. Однако такое же предположение можно сделать и на другом основании — учитывая структурные особенности других гомополимеров. Как известно из литературы, области ДНК и РНК, содержащие олиго(Г)- или олиго(С)-тракты при определенных условиях образуют четырехцепочечные структуры — G-квадруплекс и i-мотив соответственно. Эти структуры могут образовываться не только из четырех разных макромолекул, но и в одной молекуле при ее сворачивании [10, 11]. Поэтому предположение о сворачивании поли(А) с образованием внут-

римолекулярных дуплексов является вполне адекватным.

Если внутримолекулярные дуплексы обуславливают появление «замороженной» формы поли(А), то эффективность ее образования должна зависеть от факторов, влияющих на гибкость полимерной цепи, в частности от длины макромолекулы и ионной силы раствора. Ранее изучение «замороженной» поли(А)-формы мы проводили лишь в высокомолекулярных препаратах. В данной работе проведено более детальное исследование этой формы с целью лучшего понимания механизма ее образования и проверки нашего предположения о существовании внутримолекулярных дуплексов поли(А). Изучение «замороженной» формы представляет интерес также и в связи с тем, что в большинстве работ, посвященных исследованию двуспиральных поли(А), не принимались специальные меры по предотвращению ее образования и, соответственно, не учитывалось ее влияние на результаты экспериментов.

Десять лет назад мы высказали гипотезу о том, что внутримолекулярные двойные спирали олиго(А) образуются в поли(А)-трактах клеточных РНК, где они участвуют в ряде биологических процессов, таких, например, как терминация полиаденилирования, саморегуляция синтеза цитоплазматического поли(А)-связывающего белка (РАВРС), а протонирование поли(А), необходимое для их образования, осуществляется посредством окружающих белков [9, 12–14]. Во второй части настоящей работы мы возвращаемся к предложенным нами ранее моделям и обсуждаем вопрос о том, как они согласуются с современными данными литературы.

Материалы и методы

В исследованиях использовали препараты поли(А) фирм Reanal и Serva, а также агарозу фирмы BioRad.

Буфер для приготовления растворов поли(А) и проведения электрофореза при низких ионных силах содержал 5 мМ триса, уксусную кислоту, с помощью которой изменяли рН растворов, и динатриевую соль ЭДТА (0,5±2,0 мМ). Ионную силу повышали либо увеличением концентрации триса, либо добавлением ацетата натрия.

Для предотвращения образования «замороженной» формы растворы поли(А) готовили при рН ~ 7,5, затем доводили рН до ~ 5,5 кислым буфером (рН ~ 4,5) и после 10-минутного прогревания при 75–80 °С на водяной бане

раствор выдерживали 1 ч при комнатной температуре.

Условия проведения электрофореза такие же, как в работе [15]. Гели окрашивали на протяжении одного часа 0,01%-м толуидиновым голубым О, растворенном в слабощелочном буфере.

Результаты и обсуждение

1. Экспериментальные результаты. Электрофорез «замороженной» формы поли(А).

На рис. 2 представлены денситограммы поли(А) фирмы Serva (коэффициент седиментации > 10S), приготовленного в условиях, предотвращающих образование замороженной формы («Материалы и методы»). Электрофорез проведен при pH 5,5 и ионной силе 11,7 и 24,1 мМ. При этих условиях поли(А) находится в двух разных двухспиральных формах [6, 7] и [2] при электрофорезе наблюдаются две перекрывающиеся зоны полимера. Как мы показали ранее [6], относительное количество более быстрой мигрирующей формы двухспирального поли(А) увеличивается с уменьшением pH, в то время как медленнее мигрирующей формы – снижается. Мы идентифицировали [6] быстрее мигрирующую форму поли(А) с той двойной спиралью, основания которой образуют водородные связи с фосфатами, поскольку, согласно данным литературы [1, 2, 4], содержание именно этой формы увеличивается при уменьшении pH.

Как видно из рис. 2, при более высокой ионной силе (рис. 2, б) зоны поли(А) более узкие и медленно мигрирующие. Этот эффект объясняется тем, что при увеличении ионной

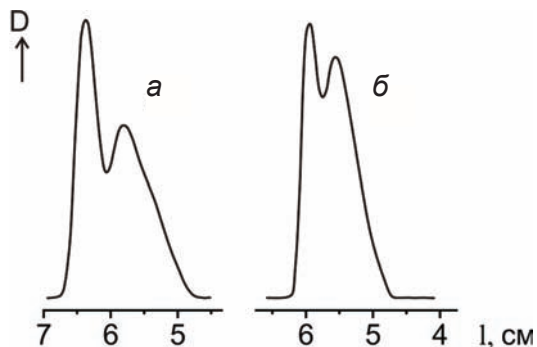


Рис. 2. Денситограммы поли(А) фирмы Serva в трис-ацетатном буфере; 0,8% агароза (pH = 5,5); а – I = 11,7 мМ; б – I = 24,1 мМ. Препараты приготовлены в условиях, предотвращающих образование «замороженной» формы («Материалы и методы»)

силы уменьшаются полный заряд и размеры молекул полимера вследствие экранирования фосфатных групп и снижения их электростатического отталкивания, что в крупнопористом геле (в данных условиях) приводит к уменьшению электрофоретической подвижности, а также к ухудшению разделения макромолекул по размеру.

На рис. 3, б и 3, в представлены денситограммы препарата поли(А) фирмы Serva, растворенного непосредственно в кислом буфере (pH 5,5) при ионной силе 8,3 и 27,9 мМ соответственно. Как видно из рисунка, при этих значениях ионной силы зона полимера значительно размыва и часть образца остается на старте. В этом случае трудно определить, как изменяется относительное количество «замороженной» формы поли(А) при изменении ионной силы.

Прогрев образца поли(А), растворенного непосредственно в кислой среде, не приводит к эффективному удалению «замороженной» формы (рис. 3, а), хотя значительно уменьшает ее количество. Однако, как показали наши исследования, термический отжиг образца, подкисленного определенным способом, при котором препарат сначала растворяют при pH ~ 7,5, а затем доводят pH до нужного значения не кислотой, а кислым буфером (pH ~ 4,5)

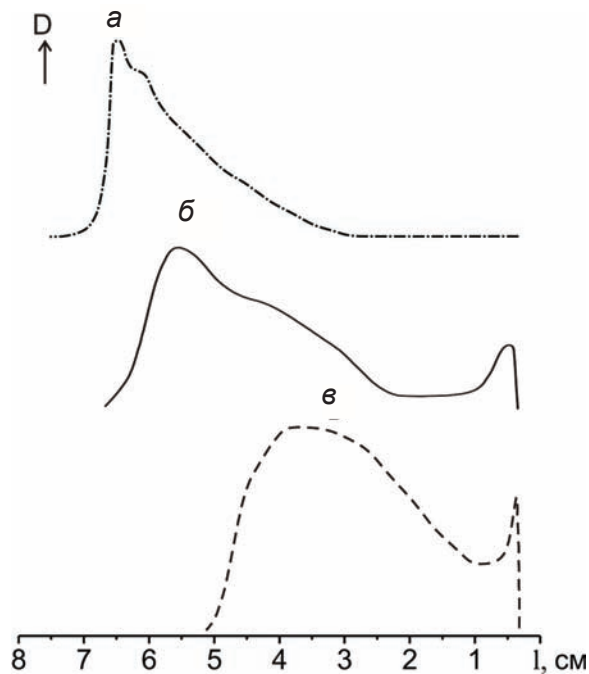


Рис. 3. Денситограммы поли(А) фирмы Serva в трис-ацетатном буфере; 0,8%-я агароза (pH = 5,5); а – препарат прогрет; а, б – I = 8,3 мМ; в – I = 27,9 мМ

предотвращает образование «замороженной» формы почти так же эффективно, как диализ нейтрального раствора полимера против кислого буфера. Такой способ подкисления использован в экспериментах, результаты которых показаны на рис. 2.

«Замороженная» форма образуется в большом количестве и при растворении в кислом буфере препаратов поли(А) фирмы Calbiochem, близких по размерам молекул к препарату фирмы Seva. Однако при приготовлении непосредственно в кислом буфере растворов поли(А) фирмы Reanal (коэффициент седиментации 4,6–5,6S) образуется лишь малое количество «замороженной» формы (рис. 4, на котором представлены денситограммы при ионной силе 6,7 и 25,9 мМ, рН 5,5).

При более низкой ионной силе (рис. 4, в) размытые зоны практически отсутствуют, хотя форма перекрывающихся зон полимера несколько изменена по сравнению с прогретым образцом (рис. 4, а), по-видимому вследствие образования небольших по размеру агрегатов «замороженной» формы. При более высокой ионной силе в случае непрогретого образца (рис. 4, з) зоны полимера заметно размываются; прогрев способствует удалению большей части размываемой области (рис. 4, б). Следует отметить, что повышение ионной силы и уменьшение молекулярной массы образцов поли(А) приводит к тому, что зоны двух двуспиральных форм полимера не разделяются (рис. 4, б).

Таким образом, увеличение длины поли(А)-цепей и/или ионной силы, способ-

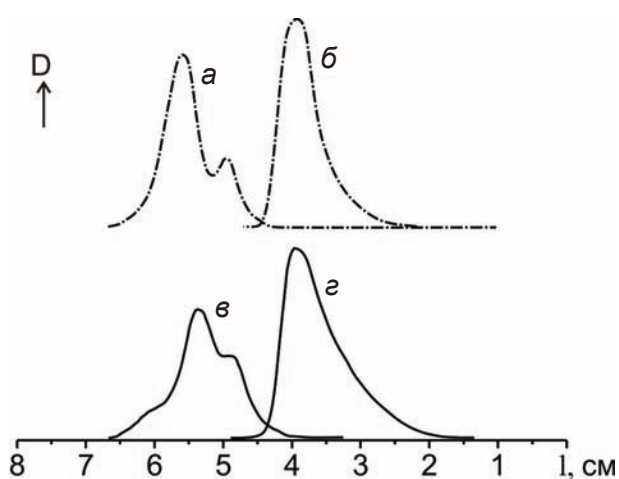


Рис. 4. Денситограммы поли(А) фирмы Reanal в трис-ацетатном буфере; 0,8%-я агароза (рН = 5,5); а, б — препарат прогрет; а, в — $I = 6,7$ мМ; б, з — $I = 25,9$ мМ

ствуя возрастанию гибкости полимера, приводит к увеличению количества «замороженной» формы. Эти результаты свидетельствуют в пользу нашего предположения о том, что поли(А) способен эффективно сворачиваться с образованием внутримолекулярных двойных спиралей, а «замороженная» форма возникает вследствие одновременного образования как межмолекулярных, так и внутримолекулярных дуплексов.

II. Молекулярные модели участия двойных спиралей поли(А) в биологических процессах и насколько они выдержали проверку временем?

Терминация полиаденилирования про-мРНК эукариотов. Учитывая, что «замороженная» форма поли(А) образуется чрезвычайно легко, мы предположили, что внутримолекулярные дуплексы могут образовываться и в поли(А)-трактах природных РНК [9, 12–14]. Возможно, что протонирование поли(А)-участков осуществляется, в частности, белками, содержащими кислые аминокислотные остатки [12].

Одним из белков, с помощью которых протонируется поли(А), является ядерный поли(А)-связывающий белок РАВРN1, N-концевой домен которого содержит 36 остатков кислых аминокислот [16]. Этот белок вместе с поли(А)-полимеразой (РАР) и фактором специфичности расщепления и полиаденилирования (СРСF) осуществляют вторую стадию процесса полиаденилирования про-мРНК высших эукариотов — синтез поли(А)-хвоста [17]. В системе *in vitro*, как и *in vivo*, РАР в присутствии СРСF и РАВРN1 синтезирует поли(А)-хвост длиной около 250 нт за один акт присоединения, т.е. процессивно. При достижении этой длины процессивная реакция добавления адениловых остатков по неизвестной причине прекращается. Полимераза при этом диссоциирует и процесс становится дистрибутивным.

Мы предположили, что 250 нт — это примерно та длина, при которой поли(А)-хвост (с присоединенными к нему молекулами белка РАВРN1) может с высокой вероятностью свернуться с образованием внутримолекулярной двойной спирали вблизи комплекса белков, осуществляющих полиаденилирование [9, 12–14]. Механическое напряжение в этом комплексе, вызванное образованием дуплекса олиго(А), приведет к его распаду. Кислые аминокислотные остатки РАВРN1 будут способствовать протонированию поли(А)-хвоста.

Механизм терминации процессивной реакции синтеза поли(А)-хвоста до сих пор неизвестен, хотя в последние годы был опубликован ряд работ на эту тему [17]. Наиболее близкое

отношение к предложенной нами гипотезе имеет работа [18], авторы которой комплексы PABPN1 с поли(A) изучали методом электронной и силовой микроскопии. Они обнаружили, что белок, связанный с поли(A), образует как нити (максимальный диаметр 7 нм), так и компактные частицы (максимальный диаметр 21 ± 2 нм). Частица размером 21 нм образуется лишь на поли(A) длиной 200–300 нт, соответствующей длине вновь синтезированного поли(A)-хвоста. Интересно, что равновесие между нитями и компактными частицами зависит от ионной силы. Частицы образуются преимущественно при умеренной и высокой ионной силе (т. е. когда молекулы полимера более гибкие).

Результаты, полученные в работе [18], не противоречат предложенной нами ранее гипотезе [9, 12–14]. Компактная частица вполне может состоять из трехцепочечной структуры, связанной с молекулами PABPN1 и включающей дуплекс олиго(A) – рис 1, б.

Реакция полиаденилирования про-мРНК дрожжей осуществляется при участии других сигнальных последовательностей на транскрипте и других белковых факторов. При этом поли(A)-хвосты имеют длину ~ 70 нт [17]. Мы предположили, что механизм терминации полиаденилирования про-мРНК дрожжей такой же, как и у высших эукариотов, но олиго(A)-дуплекс, разрушающий комплекс белков, осуществляющих синтез, может образовываться при меньшей длине поли(A)-хвоста [9, 12–14]. Главная роль в терминации полиаденилирования про-мРНК дрожжей приписывалась ранее цитоплазматическому поли(A)-связывающему белку Pab 1p, отличающегося по структуре от ядерного PABPN1. В частности, первый белок содержит четыре консервативных РНК-распознающие мотивы RRM, а второй только один такой мотив [17]. Мы предположили, что у дрожжей образованию олиго(A)-дуплекса могли бы способствовать Pab 1p и другие белки комплекса полиаденилирования [9, 12–14].

В настоящее время установлено, что контроль длины поли(A)-хвоста у мРНК дрожжей осуществляет ядерный поли(A)-связывающий белок Nab2p [19, 20]. Однако этот белок не является ни структурным, ни полностью функциональным аналогом PABPN1. Так, он не содержит мотивы RRM и связывается с РНК преимущественно мотивами «цинковый палец» типа CCCH [17]. Авторы работы [20] показали, что в отличие от Pab 1p, молекулы которых располагаются на поли(A) линейным образом, Nab2p образует комплекс с поли(A) с

иной топологией и способен более эффективно защищать поли(A) от нуклеазы.

Результаты этой работы также не противоречат нашей гипотезе [9, 12–14]. Более высокая организация комплекса поли(A) с Nab2p, чем с Pab 1p (и с его аналогом у высших эукариотов PABPC), может быть связана с образованием внутримолекулярного дуплекса (рис 1, б).

Саморегуляция синтеза белка PABPC. Вторая из предложенных нами ранее моделей вовлечения внутримолекулярных двойных спиралей олиго(A) в биологические процессы относилась к саморегуляции синтеза белка PABPC. Авторы работы [21] показали, что при избытке в цитоплазме PABPC связывается с консервативной А-богатой областью (ARS), расположенной в 5'-нетранслируемой области своей мРНК, и ингибирует свою трансляцию. ARS длиной 50–70 нт состоит из нескольких олиго(A)-трактов, чередующихся с короткими последовательностями других нуклеотидов. Позднее было показано, что рибосомные частицы 40 S задерживаются перед ARS, связанным с PABPC, и не достигают кодона инициации трансляции [22].

Мы предположили [9, 12–14], что в основе механизма саморегуляции PABPC лежит образование двойной олиго(A)-спирали либо между ARS и поли(A)-хвостом, либо внутри ARS вследствие ее сворачивания. Двойная спираль, образованная под действием PABPC и других белков, будет служить препятствием для продвижения 40 S рибосомных частиц.

Недавно авторы работ [23, 24] обнаружили, что ARS образует комплекс не только с PABPC, но по крайней мере еще с двумя белками – IMP1 и UNR. По их мнению нуклеопротеиновый комплекс, включающий ARS, PABPC, IMP1 и UNR, может служить платформой для присоединения дополнительных белков и образования еще большего по размеру комплекса – более эффективного препятствия, чем комплекс ARS–PABPC на пути такой большой молекулярной машины, как рибосомная субъединица 40 S.

И в этом случае новые данные литературы не противоречат нашей гипотезе. Более того, они позволяют предположить, что именно IMP1 и/или UNR могут способствовать образованию дуплекса поли(A). Стабилизация комплекса саморегуляции может быть связана не только с увеличением его размеров, но и с изменением структуры ARS, т.е. с образованием двойной олиго(A)-спирали. Вторичная структура 5'-нетранслируемой области влияет на эффективность инициации трансляции [25],

а дуплексы поли(А) могут усиливать ингибирующее действие комплекса белков, связанных с ARS. Кроме того, поскольку геликсаза eIF4A, вовлеченная в инициацию трансляции, может связываться непосредственно с двойной спиралью РНК, узнавая, по-видимому, определенную структуру [26], то олиго(А)-дуплекс с параллельно ориентированными цепями и неканоническими парами оснований может представлять для нее неподходящий субстрат, в отличие от РНК-дуплексов с антипараллельными цепями.

Стабилизация ARE-содержащих мРНК ELAV-подобными белками. Третья из предложенных нами ранее моделей относилась к ELAV-подобным белкам [12–14]. Белки этого семейства имеют три мотива RRM и специфически связываются как с AU-богатым участком (ARE) в мРНК, так и с поли(А)-хвостом (через третий RRM), причем возможно одновременное связывание с ARE и с поли(А)-трактом [27]. Уникальной особенностью этих белков является то, что они связываются преимущественно с длинными молекулами поли(А) (≥ 70 нт), узнавая, как предполагают авторы, какую-то вторичную или третичную структуру. В работе [28] было показано, что повышенная экспрессия ELAV-подобного белка HuR приводит к стабилизации мРНК-конструктов, содержащих ARE класса I и II, причем для проявления этого эффекта важно взаимодействие между RRM3 и поли(А)-хвостом. Учитывая эти факты, мы предположили, что HuR, связанный с ARE, индуцирует образование внутримолекулярного дуплекса в поли(А)-хвосте, который препятствует функционированию поли(А)-нуклеазы [12–14].

С ARE-содержащими мРНК, согласно современным представлениям, связываются многие белки. Одни из них причастны к ускорению распада мРНК, а другие, такие как ELAV-подобные белки, — к их стабилизации, предположительно путем конкуренции с дестабилизирующими факторами ([29] и ссылки на источники литературы в этой работе). Какие белки связываются именно с данным ARE, зависит от многих факторов: внутриклеточной локализации и концентрации белков, кинетических параметров их связывания с РНК и др.

Предложенная нами модель стабилизации ELAV-подобными белками ARE-содержащих мРНК прежде всего относится к тем случаям, когда в процесс стабилизации вовлечены длинные поли(А)-хвосты. В пользу этой модели свидетельствуют, например, результаты работы [30], где показано, что ELAV-подобный

белок HuD при повышенных уровнях экспрессии стабилизирует мРНК GAP-43, содержащие только длинные поли(А)-хвосты (по крайней мере размером в 150 нт), и его сродство к таким мРНК в 8 раз выше, чем к мРНК, имеющим поли(А)-хвосты длиной в 30 нт. Аналогичные результаты получены и в экспериментах с мРНК β -казеина [31]. Во время лактации эта мРНК приобретает длинный поли(А)-хвост, что приводит к ее стабилизации вследствие образования рибонуклеопротеинового комплекса, включающего ARE, поли(А)-хвост, HuR и PABPC.

В настоящее время обнаружено около десяти различных эукариотических белков, специфически связывающихся с поли(А), и не менее полутора десятка белков-партнеров, взаимодействующих с главным цитоплазматическим поли(А)-связывающим белком PABPC. В связи с этим могут быть предложены новые модели функционирования внутримолекулярных двойных спиралей олиго(А) в биологических процессах. Например, мы полагаем, что они могут участвовать в стабилизации мРНК c-fos [32], мРНК α -глобина [33] и мРНК ортопоксвируса [345], детальные механизмы стабилизации которых не известны.

Таким образом, в работе проведено дальнейшее исследование «замороженной» формы поли(А), которая образуется при протонировании полимера наряду с образованием двух различных двуспиральных форм. Впервые показано, что количество этой формы значительно уменьшается в низкомолекулярных образцах поли(А), особенно при низкой ионной силе раствора. Увеличение количества «замороженной» формы поли(А) с увеличением длины макромолекул и ионной силы раствора, т. е. с увеличением гибкости полимера подтверждает сделанное нами ранее предположение о том, что причиной образования этой формы является уникальная способность поли(А) легко сворачиваться с образованием внутримолекулярных двойных спиралей. Следует отметить, что другой гомополирибонуклеотид — поли(С), образующий также двойные спирали при протонировании, такой способностью не обладает [15].

Предположение о существовании внутримолекулярных двойных спиралей олиго(А) легло в основу выдвинутой нами 10 лет назад гипотезы об образовании таких спиралей в природных РНК и их участии в ряде биологических процессов. Анализ современной литературы, проведенный в настоящей работе, показывает, что эта гипотеза не потеряла своей актуальности в настоящее время и что дуп-

лексы олиго(A) могут быть вовлечены также в другие биологические процессы.

Авторы выражают благодарность Н. В. Литовченко за техническую помощь.

**ВНУТРІШНЬОМОЛЕКУЛЯРНІ
ДВОЛАНЦЮГОВІ СПІРАЛІ
ПОЛІАДЕНІЛОВОЇ КИСЛОТИ
ТА ЇХНЯ МОЖЛИВА БІОЛОГІЧНА
ЗНАЧУЩІСТЬ**

*М. І. Зарудна, А. В. Степанюгін,
А. Л. Потягайло, Д. М. Говорун*

Інститут молекулярної біології і
генетики НАН України, Київ;
e-mail: m.i.zarudna@imbg.org.ua

Під час протонування одноланцюгового полі(A) водночас з утворенням двох дволанцюгових форм полімера формується і так звана «заморожена» форма. У цій роботі методом електрофорезу показано, що її кількість зростає зі збільшенням довжини полі(A) та іонної сили розчину, тобто при зменшенні жорсткості полімерного ланцюга. Ці результати підтверджують висловлене нами раніше припущення щодо здатності полі(A) згортатися, утворюючи внутрішньомолекулярні одноланцюгові спіралі. Десять років тому ми сформулювали гіпотезу, згідно з якою внутрішньомолекулярні дуплекси можуть утворюватися також і в полі(A)-трактах клітинних РНК та брати участь у низці біологічних процесів. Аналіз даних літератури, які опубліковано відтоді, свідчить про адекватність гіпотези і показує, що вона не втратила своєї актуальності і нині.

Ключові слова: поліаденілова кислота і її «заморожена» форма; електрофорез; внутрішньомолекулярні подвійні спіралі; термінація поліаденілування; саморегуляція синтезу цитоплазматичного білка, що зв'язує полі(A); стабілізація мРНК.

**INTRAMOLECULAR DOUBLE-
STRANDED HELICES
OF POLYADENYLIC ACID AND THEIR
POSSIBLE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE**

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

Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: m.i.zarudna@imbg.org.ua

S u m m a r y

Under protonation of the single-stranded polyadenylic acid so called «frozen» form arises simultaneously with formation of two double-stranded forms. It has been shown that a portion of the polyadenylic acid «frozen» form increases with the size of poly(A) and ionic strength of solution, i. e. with an increase of polymer chain flexibility. These findings may be considered as evidences in favor of our earlier supposition on poly(A) ability to fold with formation of intramolecular double-stranded helices. Ten years ago we also proposed a hypothesis that such double-stranded helices can be formed in poly(A) tracts of cellular RNAs and they can participate in several biological processes. An analysis of literature data published later evidences for the hypothesis adequacy and shows that it still remains urgent.

Key words: poly(A), electrophoresis, «frozen» form, intramolecular double-stranded helices, polyadenylation termination, autoregulation of cytoplasmatic poly(A) binding protein synthesis, mRNA stabilization.

1. *Finch J. T., Klug A.* // *J. Mol. Biol.* — 1969. — **46**, N 3. — P. 597–598.
2. *Adler A. J., Grossman L., Fasman G. D.* // *Biochemistry.* — 1969. — **8**, N 9. — P. 3846–3859.
3. *Janik B., Sommer R. G., Bobst A. M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1972. — **281**, N 2. — P. 152–168.

4. *Lerner D. B., Kearns D. R.* // *Biopolymers.* – 1981. – **20**, N 4. – P. 803–816.
5. *Зарудная М. И., Желтовский Н. В.* // *Молекуляр. биология.* – 1992. – **26**, № 1. – С. 110–117.
6. *Зарудная М. И., Желтовский Н. В.* // Там же. – 1995. – **29**, № 5. – С. 1040–1047.
7. *Зарудная М. И.* // Там же. – 1998. – **32**, № 3. – С. 508–514.
8. *Paleček E., Vetterl V., Šponar J* // *Nucleic Acids Res.* – 1974. – **1**, N 3. – P. 427–442.
9. *Зарудна М. І., Говорун Д. М.* // *Доп. НАН України.* – 1998. – № 12. – С. 155–160.
10. *Shafer R. H., Smirnov I.* // *Biopolymers.* – 2001. – **56**, N 3. – P. 209–227.
11. *Guéron M., Leroy J.-L.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2000. – **10**, N 3. – P. 326–331.
12. *Zarudnaya M. I., Hovorun D. M.* // *Укр. біохім. журн.* – 1999. – **71**, № 4. – С. 15–20.
13. *Zarudnaya M. I.* // *Биополимеры и клетка.* – 1999. – **15**, № 3. – С. 195–199.
14. *Zarudnaya M. I., Hovorun D. M.* // *IUBMB Life.* – 1999. – **48**, N 6. – P. 581–584.
15. *Зарудная М. И., Степанюгин А. В., Потягайло А. Л., Говорун Д. Н.* // *Біополімери і клітина.* – 2008. – **24**, № 1. – С. 69–77.
16. *Nemeth A, Krause S., Blank D. et al.* // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – **23**, N 20. – P. 4034–4041.
17. *Kühn U., Wahle E.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – **1678**, N 2–3. – P. 67–84.
18. *Keller R. W., Kühn U., Aragón M. et al.* // *J. Mol. Biol.* – 2000. – **297**, N 3. – P. 569–583.
19. *Dheur S, Nykamp K.R, Viphakone N. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, N 26. – P. 24532–24538.
20. *Viphakone N., Voisinet-Hakil F., Minvielle-Sebastia L.* // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – **36**, N 7. – P. 2418–2433.
21. *de Melo Neto O. P., Standart N., de Sa C. M.* // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – **23**, N 12. – P. 2198–2205.
22. *Bag J.* // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 50. – P. 47352–47360.
23. *Patel G. P., Ma S., Bag J.* // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – **33**, N 22. – P. 7074–7089.
24. *Patel G. P., Bag J.* // *FEBS J.* – 2006. – **273**, N 24. – P. 5678–5690.
25. *Kozak M.* // *Gene.* – 2005. – **361**. – P. 13–37.
26. *Rogers G. W., Lima W. F., Merrick W. C.* // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 16. – P. 12598–12608.
27. *Ma W.-J., Chung S., Furneaux H.* // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – **25**, N 18. – P. 3564–3569.
28. *Fan X. C., Steitz J. A.* // *The EMBO J.* – 1998. – **17**, N 12. – P. 3448–3460.
29. *Park-Lee S., Kim S., Laird-Offringa I. A.* // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 41. – P. 39801–39808.
30. *Beckel-Mitchener A. C., Miera A., Keller R., Perrone-Bizzozero N. I.* // *Ibid.* – 2002. – **277**, N 31. – P. 27996–28002.
31. *Nagaoka K., Suzuki T., Kawano T. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – **1759**, N 3–4. – P. 132–140.
32. *Chang T. C., Yamashita A., Chen C.-Y. A. et al.* // *Genes Dev.* – 2004. – **18**, N 16. – P. 2010–2023.
33. *Waggoner S. A., Liebhaber S. A.* // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2003. – **228**, N 4. – P. 387–395.
34. *Bergman N., Moraes K. C. M., Anderson J. R. et al.* // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – **14**, N 9. – P. 824–831.

Получено 04.07.2008