

27. Martinez M. A. RNA Interference and viruses: current innovations and future trends / M. A. Martinez // – Caister Academic Press, - 2010. – 252 p.
28. Maillard P.V. Antiviral RNA interference in mammalian cells / P.V. Maillard, C. Ciaudo, A. Marchais [et al.] // Science. - 2013. – Vol. 342, № 6155. – P. 235-238.
29. Orrell C. Resistance in pediatric patients experiencing virologic failure with first-line and second-line antiretroviral therapy / C. Orrell, J. Levison, A. Ciaranello // *Pediatr Infect Dis J.* – 2013. – Vol. 32, № 6. – P. 644-647.
30. Putral L. RNA interference for the treatment of cancer / L. Putral, W. Gu, N. McMillan // *Drug News Perspect.* – 2006. – Vol. 19, № 6. – P. 317-324.
31. Sah D. Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders / D. Sah // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 79, № 19. – P. 1773-1780.
32. Sullenger B. A. Emerging clinical applications of RNA / B. A. Sullenger, E. Gilboa. // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 252-258.
33. ter Brake O. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition / O. ter Brake, K. Hooft, Y. Po Liu [et al.] // *Molecular Therapy.* – 2008. – Vol. 16, №3. – P. 557-564.
34. ter Brake O. Evaluation of safety and efficacy of RNAi against HIV-1 in the human immune system (Rag-2-/-γc-/-) mouse model / O. ter Brake, N. Legrand, K.J. von Eije [et al.] // *Gene Therapy.* – 2009. – Vol. 16. – P. 148-153.
35. The 2006 Nobel Prize in physiology or medicine. – Access mode: <http://www.webcitation.org/61CfnnPLi>.
36. Wolkowicz R. Gene therapy progress and prospects: Novel gene therapy approaches for AIDS / R. Wolkowicz, G.P. Nolan // *Gene Therapy.* - 2005. – Vol. 12. – P. 467-476.
37. Yamato K. New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer / K. Yamato, T. Yamada, M. Kizaki // *Cancer Gene Therapy.* – 2008. – Vol. 15. – P. 140-153.

### Реферати

#### ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В ЛЕЧЕНИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Черникова Л. И., Коваленко Н. И.

Проведен анализ результатов исследований применения системы РНК-интерференции для подавления репродукции ВИЧ в чувствительных клетках на разных этапах жизненного цикла вируса и для блокирования ко-рецепторов CCR5 клеток человека.

**Ключевые слова:** генотерапия, РНК-интерференция, ВИЧ-инфекция.

Стаття надійшла 3.02.2015 р.

#### PROSPECTS OF RNA-INTERFERENCE IN THE TREATMENT OF HIV-INFECTION

Chernikova L. I., Kovalenko N. I.

The results of trials of RNA-interference system to inhibit HIV replication in sensitive cells at different stages of the viral life cycle and blocking CCR5 co-receptor of human cells were conducted.

**Key words:** gene therapy, RNA interference, HIV infection.

Рецензент Куш О.Г.

УДК 616 – 006.6 : 577.2

О. В. Харченко

Полтавський національний педагогічний університет ім. В. Г. Короленка, м. Полтава

#### МІКРОСАТЕЛІТНІ ЕКСПАНСІЇ – МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИЙ ФЕНОМЕН ДІАГНОСТИКИ ПЕРЕДПУХЛИННИХ І ПУХЛИННИХ ПРОЦЕСІВ

Насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом дії факторів, які визначають їх композиційні, структурні та термодинамічні особливості. Мікросателіти можуть знаходитись в геномі скрізь, як в некодуючих, так і в кодуючих послідовностях, впливаючи на транскрипційну активність. Поліморфізм мікросателітів може бути виявлений їх морфологічними характеристиками. Інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії. Здатність повторів до експансії залежить від довжини мікросателітної послідовності. Співвідношення між мутаційними подіями, що призводять до збільшення мікросателітних послідовностей за рахунок додавання повтору, співвідносяться з кількістю мутацій, що призводять до зменшення кількості повторів в мікросателітах людини як 10:4.

Поліморфізм мікросателітів може визначатись їх локалізацією та орієнтацією в геномі. Вторинна структура ДНК розглядається сьогодні як причина експансії мікросателітних послідовностей. Сама вторинна структура ДНК є похідною термодинамічних характеристик її послідовності. Розрахунки термодинамічних характеристик повторюваних послідовностей дозволили розробити ряд модельних систем, оцінюючих здатність мікросателітних послідовностей впливати на модифікації ДНК, формуючи різні вторинні структури, пов'язані з нестабільністю мікросателітів. Існує дві групи маркерів, що отримують в результаті PCR: перша – відома як STSs (sequence-tagged sites) з праймерами, сконструйованими з відомих послідовностей, і друга – що базується на довільних праймерах. Найінформативніший або поліморфний STS-маркер з'являється тоді, коли ампліфікується дільниця ДНК, що вміщує послідовності мікросателітних повторів. Такий маркер, базується на STS, і позначений як simpl-sequence length polymorphism (SSLP) або sequence-tagged microsatellit site (STMS). Кожний STMS-маркер детектує успадковані кодомінантні алелі в одиничному локусі в геномі.

**Ключові слова:** мікросателітні послідовності, мікросателітні експансії, помилки реплікації, нестабільність мікросателітів, маркери на основі PCR.

*Робота є фрагментом НДР «Формування сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини» (№ держреєстрації 0110U002649).*

Раніше, з метою діагностики онкологічних новоутворень, активно використовувались тільки класичні методи цитології та гістології. Але, останні десятиліття класичні підходи швидко

витісняються молекулярно-біологічними маркерами, які найбільш адекватно відповідають комплексу вимог щодо маркерів: високо поліморфна природа, кодомінантний тип успадкування, широка представленість в геномі, доступні методики їх отримання, високий рівень відтворюваності, можливість обміну даними між лабораторіями [1].

Літературні дані свідчать, що нестабільність геному робить можливим накопичення в клітині мутацій, які призводять до появи гетерогенності клітинної популяції. Високий проліферативний потенціал таких клітин призводить до генералізації злоякісного процесу [6]. Злоякісна трансформація клітин, згідно з сучасними уявленнями, виникає при накопиченні незалежних мутацій і епігеномних змін, наслідком яких є порушення регуляції клітинного циклу, генетична нестабільність, зміни морфології і диференціювання клітин [8]. Наслідком цього може бути поява нового фенотипу злоякісної клітини [2, 3, 4].

Пошуки зручних та швидких можливостей візуалізації поліморфізму послідовностей ДНК в останні роки призвели до виникнення широкого спектру технік (рис.1.). Ці техніки використовуються як поодиночі, так і в різних поєднаннях [7, 8]. Для оцінки поліморфізму ДНК на теперішній час використовують різні типи ДНК-маркерів, які умовно можна розділити на 3 групи: рестрикційні маркери, гібридаційні маркери, та маркери, отримані на базі полімеразної ланцюгової реакції. В першому випадку візуалізуються фрагменти ДНК, отримані в наслідок рестрикції геномної ДНК різними ендонуклеазами, наприклад, метод RFLP та його модифікації. Для отримання гібридаційних маркерів використовується метод гібридації з міченими зондами, якими є ділянки ДНК з відомою послідовністю та походженням, наприклад, FISH- гібридація або гібридація на мембранах. Але, рівень поліморфізму таких маркерів не завжди достатньо високий [9].

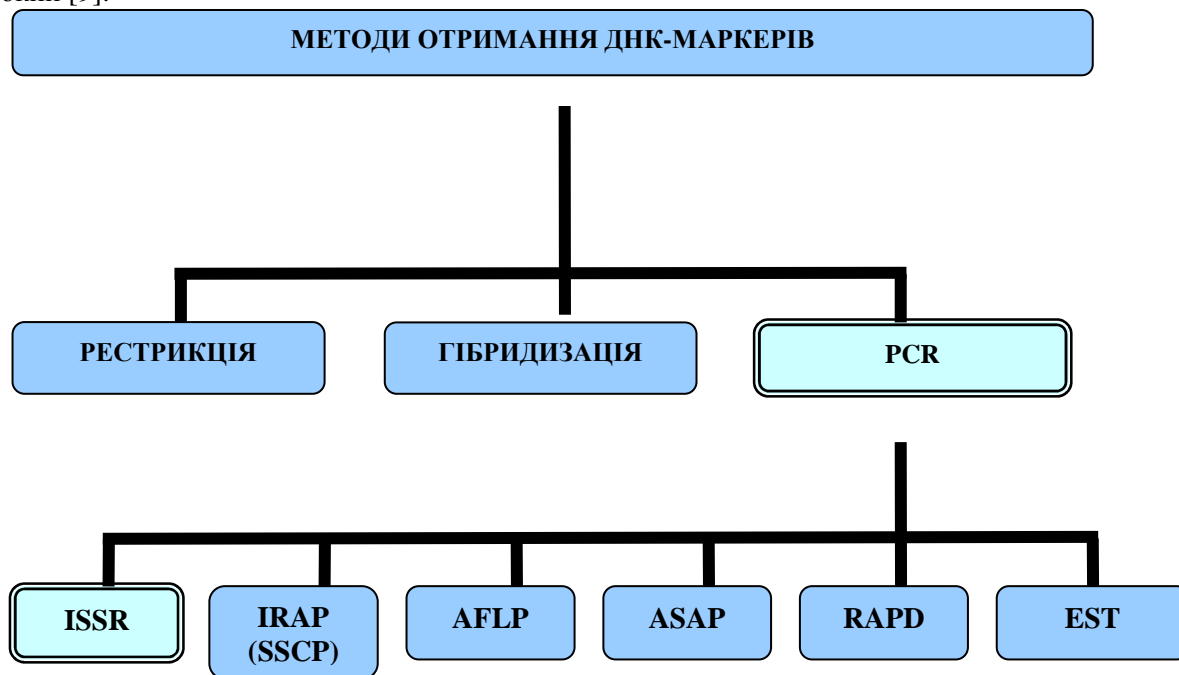


Рис.1. Техніки отримання ДНК-маркерів.

Маркери, отримання яких базується на проведенні полімеразної ланцюгової реакції (PCR), є продуктами ампліфікації *in vitro*. При цьому праймери можуть бути як сайт-специфічними, так і випадково підібраними. Ампліфікаційні фрагменти розділяють електрофоретично і спектр продуктів ампліфікації візуалізується різними способами, такими, наприклад, як забарвлення або авторадіографія [10, 11].

PCR є універсальною технікою, яку активно використовують з середини 80-х років XX ст. Після виділення термостабільної Taq-полімерази в 1988 р. області використання методу незвичайно розширились. Серед численних технік, основаних на використанні PCR, арсенал яких має сучасна молекулярна генетика, таких як STS (sequence tagged sites), ASAPs (Allele specific associated primers), EST (Expressed sequence tag markers), SSCP (Single strand conformation polymorphism), RABD (Randomly-amplified polymorphic DNA markers), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) особливе місце займають маркери, що є фрагментами ДНК, розташованими між локусами інвертних повторів ДНК: ISSR (Inter simple sequence repeats), IRAP (Inter

retrotransposon amplification products). Останні два класи маркерів відрізняються високим рівнем поліморфізму і відтворюваності, що забезпечує можливість міжлабораторних порівнянь. Перші є фрагментами геномної ДНК, що знаходяться між інвертними мікросателітними повторами, до яких підібраний один відповідний мікросателітний праймер, другі – фрагментами геномної ДНК, що знаходяться між інвертними специфічними послідовностями ретротранспозонів, до яких відповідно підібрані пара сайт-специфічних праймерів [12].

Використанню цих маркерів передують відкриття того факту, що еукаріотні геноми в середньому на 30-90% представлені високо поліморфними повторюваними послідовностями. Такі регіони геному включають багато алелей, що відрізняються одна від одної за довжиною, нуклеотидною послідовністю, за тандемним або рівномірним типом локалізації в геномі. Повторювана ДНК виконує своєрідну функцію по абсорбції мутацій в геномі. Високий рівень мутацій в повторюваній ДНК, її нейтральність по відношенню до діючих факторів, а також широке представництво в еукаріотних геномах, робить її незамінною для отримання високополіморфних маркерів [13].

Для інтерпретації даних, отриманих з використанням цих класів маркерів, важливо пам'ятати, які генетичні події та механізми забезпечують рівень їх поліморфізму, тобто, що може привести до втрати або з'явлення нових ампліфікаційних фрагментів в спектрах ампліфікації. Для обох класів маркерів присутність амплікона розцінюється як домінуючий стан алелі даного локусу, відсутність ампліфікаційного фрагменту враховується відповідно як рецесивний алель локусу. Високий рівень поліморфізму обох типів маркерів, очевидно є відображенням якостей в послідовностях повторюваних ДНК на базі яких ці маркери були отримані. Клас повторюваних послідовностей дуже гетерогенний. Умовно, виходячи з функціональних особливостей повторюваної ДНК, її можна представити у вигляді двох класів [13, 14]: - Клас функціональних послідовностей, до яких відносяться сімейства диспергованих за геномом і тандемно розташованих генних сімейств; - Клас повторюваних послідовностей з неясними функціями, до яких відносяться: а) – транспозуючі послідовності, поділяють в свою чергу на дисперговані – SINE (короткі) і LINE (довгі) повтори, б) – тандемні повтори, що повторюються з різною частотою. До останніх відносяться повтори в центромерних гетерохроматинових регіонах, тіломерні послідовності, мікросателіти і мінісателіти.

Молекулярно-біологічний метод, що базується на ампліфікації шляхом ISSR-PCR ділянок ДНК зразків слизової оболонки шлунка, останні вміщують послідовності мікросателітних повторів. При використанні одного ISSR-праймеру S2, який має структуру: (AGC)<sub>6</sub>G, можливо одразу аналізувати 8-16 локусів [15, 16].

Характер і закономірності розподілення в геномі трьохнуклеотидних мікросателітів має особливий інтерес завдяки тій ролі, яку вони відіграють в розвитку онкологічної трансформації [17]. Мікросателітна експансія – інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок, цей феномен використовується в діагностиці передпухлинних і пухлинних змін клітин [18]. Здатність повторів до експансії також залежить від довжини мікросателітної послідовності. Наприклад, у людини сиквенс-аналіз дозволив виявити, що таким мутаційним подіям придатні гомогенні мікросателітні алелі з кількістю повторів рівним або більшим одинадцяти [5]. Співвідношення між мутаційними подіями, що призводять до збільшення мікросателітних послідовностей за рахунок додавання повтору, співвідносяться з кількістю мутацій, що призводять до зменшення кількості повторів в мікросателітах людини як 10:4 [18].

### Висновок

Відносна насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом дії багатьох факторів, серед яких одним з основних є рівень стабільності мікросателітної ДНК, що визначається реплікаційними та репараційними процесами, мутаційними подіями та модифікацією ДНК [15].

### Список літератури

1. Abramov D. D. Tochnost' metoda polimeraznoj cepnoj reakcii «v real'nom vremeni» / D. D. Abramov, D. Ju. Trofimov, D. V. Rebrikov // Prikl. Biohimija i mikrobiologija. – 2006. T.42. S.485 – 488.
2. Markovs'kij V. D. Kompleksna patomorfologichna diferencijna diagnostika peredpuhlinnih procesiv i raku shlunka / V. D. Markovs'kij, O. V. Harchenko // Patologija. – 2012. – №3. – S. 15–18.
3. Markovs'kij V. D. Vijavlennja diseminovanih puhlinnih klitin u periferichnij krovi u hvorih na virazkovno-infil'trativnij rak shlunka / V. D. Markovs'kij, O. V. Harchenko // Visnik morfologii. – 2012. –T.18, №1. – S.135–139.
4. Pat. 76768 Ukraïna A61V 10/00. Sposib diagnostiki infil'trativno-virazkovogo raku shlunka / O.V. Harchenko, V.D. Markovs'kij, V.M. Balac'kij. – u 2012 09011; zajavl. 23.07.2012.; opubl. 10.01.2013; Bjul. №1.

5. Rebrikov D. V. PCR «v real'nom vremeni» / D. V. Rebrikov, G. A. Samatov, D. Ju. Trofimov [i dr.] // – M. : BINOM. Laboratorija znanij, - 2009. – 215 s.
6. Baldi P. Sequence analysis by additive scales: DNA structure for sequences and repeats lengths / P. Baldi, P.F. Baisnee // Bioinformatics. – 2000. – Vol. 16. – P. 865 – 889.
7. Bull L. Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features / L. Bull, C.R. Pabon-Pena., N. B. Freimer // Genome Res. – 2000. – №9. – P. 830 – 838.
8. Brohede J. Individual variation in microsatellite mutation rate in barn swallows / J. Brohede, A.P. Moller, H. Ellegren // Mutat Res. – 2004. – №12. – P.73-80.
9. Bordonì A. A microarray platform for parallel detection of five transgenic events in foods: a combined polymerase chain reaction-ligation detection reaction-universal array method / A. Bordonì, A. Germini, A. Mezzelani [et al.] // J Agric Food Chem., - 2005. – Vol. 53 – P. 912 – 918.
10. Cleary J. D. Replication fork dynamics and dynamic mutations: the fork-shift model of repeat instability / J. D. Cleary, C. E. Pearson // Trends Genet. – 2005. – № 21. – P. 272–280.
11. Cowan C. A. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells / C.A. Cowan // Science. – 2005. – Vol. 309. – P.1369 – 1373.
12. Hartenstine M. J. Base stacking and even/odd behavior of hairpin loops in DNA triplet repeat slippage and expansion with DNA polymerase / M.J. Hartenstine, M.F. Goodman, J. Petruska // J Biol Chem. – 2000. – №24. – P.18382 – 18390.
13. Hernandez M. Interlaboratory transfer of a PCR multiplex method for simultaneous detection of four genetically modified maize lines: Bt11, MON810, T25, and GA21 / M. Hernandez, D. Rodriguez-Lbzarò, D. Zhang [et al.] // J Agric Food Chem. – 2005. Vol.53 – P. 3333 – 3337.
14. Leontis N. B. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices / N.B. Leontis, N. Stombaugh, J. Westhof // Nucl.Acid.Res. – 2002. – № 3. – P. 3497 – 3591.
15. Makova K. D. Evolution of microsatellite alleles in four species of mouse Genus apodemus / K.D. Makova, A. Nekrutenko, R.J. Baker // J Mol Evol. – 2000. – № 51. – P.166 – 172.
16. Scotti I. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (Picea abies K.) expressed sequences / I. Scotti, F. Magni, R. Fink [et al.] // Genome. – 2000. – № 4. – P. 41 – 46.
17. Wren D. J. Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implication / D. J. Wren, E. Forgacs, J.W. Fondon [et al.] // – 2000. - № 67. – P.345 – 356.
18. Xu X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length / X. Xu, M. Peng, Z. Fang // Nat Genet. – 2000. – Vol.4. – №4. – P. 396 – 399.

#### Реферати

#### МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЭКСПАНСИИ – МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФЕНОМЕН ДИАГНОСТИКИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ

Харченко А. В.

Насыщенность геномов микросателлитными последовательностями являются результатом действия факторов, которые определяют их композиционные, структурные и термодинамические особенности. Микросателлиты могут находиться в геноме везде, как в некодирующих, так и в кодирующих последовательностях, влияя на транскрипционную активность. Полиморфизм микросателлитов может выявляться их морфологическими характеристиками. Интенсивное удлинение микросателлитных последовательностей за счёт репликационных ошибок называется микросателлитными экспансиями. Способность повторов к экспансии зависит от длины микросателлитной последовательности. Соотношение между мутационным влиянием, которое ведёт к увеличению микросателлитных последовательностей за счёт прибавления повтора, соотносится с количеством мутаций, которые приводят к уменьшению количества повторов в микросателлитах человека как 10:4. Полиморфизм микросателлитов может определяться их локализацией и ориентацией в геноме. Вторичная структура ДНК рассматривается сегодня как причина экспансии микросателлитных последовательностей. Сама вторичная структура ДНК является производной термодинамических характеристик её последовательности. Расчёты термодинамических характеристик повторяющихся последовательностей позволили разработать ряд модельных систем, оценивающих способность микросателлитных последовательностей влиять на модификации ДНК, формируя разные вторичные структуры, связанные с нестабильностью микросателлитов. Существует две группы

#### MICROSATELLITE EXPANSION – MOLECULAR- BIOLOGICAL PHENOMEN OF DIAGNOSIS PRECANCEROUS AND CANCEROUS PROCESSES

Kharchenko A. V.

Relative saturation of genomes with any microsatellite sequences is the result of influence of many factors, which all in all determine composite, structural and thermodynamic features of genomic microsatellite sequences. Polymorphism of microsatellites can be identified by their morphological characteristics. The difference in the degree of polymorphism between various microsatellites may depend first on the length of microsatellite sequence itself. Intensive extension of microsatellite sequences due to replication errors is called microsatellite expansion. The ability of repeats to expansion depends on the length of microsatellite sequence. The relations between mutative events, leading to expansion of microsatellite sequences due to addition of a repeat, correlates with number of mutations, which lead to reduction of repeats in human microsatellites as 10:4. Polymorphism of microsatellites can be identified by their localization and orientation in genome. The secondary structure of DNA is currently viewed as the cause of expansion of microsatellite sequences. The secondary structure of DNA itself is the derivative of thermodynamic characteristics of its sequence. The secondary bulge-type structures in microsatellite sequences, identified by their thermodynamic characteristics, can initiate the phenomenon of expansion of microsatellite repeats. The more stable these bulges, the lower is the risk of formation of new microsatellite repeats. Calculations of thermodynamic characteristics of replicable sequences allow developing number of model systems, evaluating the ability of microsatellite sequences to influence the DNA modifications, forming various secondary structures, related

маркеров, которые получают в результате PCR: первая – известна как STSs (sequence-tagged sites) с праймерами, сконструированными из известных последовательностей, и другая – которая базируется на свободных праймерах. Наиболее информативный или полиморфный STS-маркер появляется тогда, когда амплифицируется участок ДНК, который содержит последовательности микросателлитных повторов. Такой маркер, базируется на STS, и отмечен как simpl-sequence length polymorphism (SSLP) или sequence-tagged microsatellit site (STMS). Каждый STMS-маркер детектирует наследуемые кодоминантные алели в единичном локусе в геноме.

**Ключевые слова:** микросателлитные последовательности, микросателлитные экспансии, ошибки репликации, нестабильность микросателлитов, маркеры на основе PCR.

to phenomenon of expansion of microsatellite repeats. Types of markers, obtained as a result of PCR, are divided into two groups on the basis of primers' design: the first group is known as STSs (sequence-tagged sites) with primers, constructed from known sequences, and the second one is based on the random primers. The most informative or polymorphic STS-marker emerges during amplification of DNA-area, containing sequences of microsatellite repeats. This marker is based on STS, and is marked as simple-sequence length polymorphism (SSLP) or sequence-tagged microsatellite site (STMS). Each STMS-marker detects inherited codominant alleles in single locus in genome.

**Key words:** microsatellite sequences, microsatellite expansions, replication errors, microsatellite instability, PCR-based markers.

Стаття надійшла 4.03.2015 р.