

ПОТЕНЦІЙНІ G-КВАДРУПЛЕКСИ В ГЕНОМІ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Балак О. К.

Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

Лиманська О. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: olgaliman@ukr.net

Збагачені гуаніном фрагменти ДНК та РНК є схильними утворювати стабільні неканонічні вторинні структури — G-квадруплекси (G4), — які можуть мати різну топологію. Канонічні G4 містять 2–4 G-тетради, які стабілізовано стекінг-взаємодією, Хугстинівськими водневими зв'язками та з'єднано петлею з 1–12 нуклеотидів. З аналізу нуклеотидної послідовності визначено консервативні G-квадруплекси, які можуть утворюватися у геномній РНК та у провірусній ДНК вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ). Додатково до відомих в 3'LTR РНК ВІ ВРХ потенційних G4 ідентифіковано 20 стабільних консервативних мотивів G-квадруплексів для «+»-нитки РНК, а також послідовності «–»-нитки провірусної ДНК, значення G-рахунка (відносного параметра, що характеризує стабільність G4) яких варіює від 33 до 36. Показано, що два фрагменти з потенційними G4, які раніше ідентифіковано тільки для 3'U5 LTR, є прямими повторами та локалізовано також в 5'R5 LTR. Створено карту локалізації на геномі ВІ ВРХ потенційних стабільних консервативних внутрішньомолекулярних G-квадруплексів, що утворено двома G-тетрадами. G4 нерівномірно розподілено по геному, найвищу щільність визначено для генів *tmx* (5.4 G4 на 1000 н.) та *rol* (2.8 G4 на 1000 н.). Доведено важливість пошуку G4 в послідовності «–»-нитки провірусної ДНК, в якій ідентифіковано один G4

Ключові слова: вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ), G-квадруплекс, неканонічна структура

Однією з важливих властивостей молекул нуклеїнових кислот є конформаційні еластичність та гнучкість, що сприяє утворенню в їх послідовностях вторинних неканонічних структур, до числа яких належать, зокрема, G-квадруплекси (G4). Це стабільні чотириланцюгові структури, які утворено збагаченими гуаніном ділянками ДНК або РНК *in vitro* або *in vivo* (за участі певних протеїнів). G-квадруплекси стабілізовано Хугстинівськими водневими зв'язками, стекінг-взаємодією, а також одновалентними катіонами K^+ та Na^+ . G-квадруплекси можуть бути паралельними та антипаралельними залежно від орієнтації ланцюгів, а також внутрішньомолекулярними, утвореними планарними G-тетрадами одного ланцюга, з'єднаними петлею з 1-12 нуклеотидів (н.), або міжмолекулярними, утвореними двома або чотирма ланцюгами [1].

Передбачення G-квадруплексів та пошук мотивів з потенціалом утворення цих неканонічних структур здійснюють шляхом біоінформатичного аналізу з використанням сучасних програмних пакетів та алгоритмів [2]. Для визначення та вивчення G-квадруплексів *in vitro* використовують біофізичні (насамперед, спектроскопію кругового діхроїзму) та біохімічні (зокрема, футпринтінг з використанням діметилсульфату) методи. Проведення досліджень *in vivo* стосовно функцій G4, їх розташування та візуалізації потребує застосування методів з високою просторовою роздільною здатністю [3, 4].

Існування G-квадруплексів встановлено у геномах різних таксономічних груп організмів [5–7]. Найчастіше G4 та послідовності з потенціалом їх утворення локалізовано у промоторах генів та довгих кінцевих повторах [8].

Неканонічні вторинні структури (G-квадруплекси, триплекси, шпилькові структури, і-мотиви тощо) часто є ключовим компонентом різних біологічних процесів. G-квадруплекси відіграють важливу роль у регуляції трансляції та транскрипції, онкогенезі, патогенності та антигенній варіабельності мікроорганізмів; можуть впливати на вірулентність та життєвий цикл деяких

вірусів та бути асоційованими з низкою захворювань людини і тварин тощо [9–11]. Це робить дослідження щодо пошуку або ідентифікації мотивів з потенціалом утворення G4 у геномі патогенів як людини, так і тварин, насамперед сільськогосподарських завдяки економічній значущості, вельми актуальними та дає підстави вважати G-квадруплекси потенційними мішенями при проведенні антивірусної терапії.

Утворення консервативного G-квадруплекса у промоторі гена *EPO* вірусу хвороби Ауески (псевдосказу), який модулює життєвий цикл даного герпесвірусу, було підтверджено з використанням гель-електрофорезу у поліакриламідному гелі, спектроскопії кругового діхроїзму, а також низки біохімічних методів [12]. У генах *S* та *Nsp-5* вірусу епідемічної діареї свині було визначено дві послідовності з потенціалом утворення G-квадруплексів за допомогою біоінформатичного аналізу, а можливість формування G4 у геномі цього коронавірусу продемонстровано *in vitro* з використанням низки біофізичних методів [13]. Здатність утворювати G-квадруплекси у присутності іонів K^+ *in vitro* підтверджено з використанням спектроскопії кругового діхроїзму та біохімічного аналізу для 8 консервативних фрагментів з потенціалом утворення G4, виявлених у геномі вірусу африканської чуми свиней шляхом біоінформатичних досліджень [14].

Вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ) належить до ретровірусів, геном яких містить дві копії «+»-нитки РНК. Зворотна транскриптаза, яку кодує геном вірусу, транскрибує вірусну РНК в дволанцюгову ДНК, яку вірусна інтеграза потім інтегрує в геном клітини хазяїна та яку визначають як провірусну ДНК [15].

Раніше для ретровірусів ВРХ — вірусу імунодефіциту та вірусу лейкозу (ВЛ) — визначено розподіл потенційних внутрішньомолекулярних шпилькових структур та триплексів; представлено карти геномів вірусів з урахуванням позицій визначених неканонічних структур; встановлено, що розподіли шпильок та триплексів у геномах ВІ ВРХ та ВЛ ВРХ відрізняються якісно та кількісно та запропоновано використовувати карти їх локалізації для структурної диференціації геномів бактерій та вірусів [16–18]. Проте, до теперішнього часу в доступній літературі відсутня інформація щодо наявності в геномі ретровірусів ВРХ мотивів з потенціалом утворення G4.

В даній роботі на підставі послідовностей ізолятів вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби з повним геномом визначено потенційні консервативні G-квадруплекси, які можуть бути утворено двома G-тетрадами (рис. 1) у геномній РНК та у провірусній ДНК даного ретровірусу.

Матеріали і методи. Нуклеотидні послідовності трьох ізолятів ВІ ВРХ (у тому числі, двох з повним геномом — L04974, NC_001413, — беручи до уваги, що послідовність останнього є ідентичною до такої ізоляту M32690) отримано через пошук таксономічного ідентифікатора (txid) 11657 в базі даних GenBank Національного центру біотехнологічної інформації (США).

Програму BioEdit (версія 7.2.5) [20] використано для побудови консенсусної повногеномної послідовності РНК ВІ ВРХ. Пошук мотивів GGG в геномній РНК та провірусній ДНК ВІ ВРХ, маніпулювання з нуклеотидними послідовностями та множинне вирівнювання проведено за допомогою програми Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (версія 6.06) [21].

Для пошуку внутрішньомолекулярних G-квадруплексів в геномній РНК та одностанцюговій провірусній ДНК ВІ ВРХ, а також для визначення G-рахунка (параметра, який характеризує стабільність G-квадруплекса у відносних одиницях) використано програму для аналізу

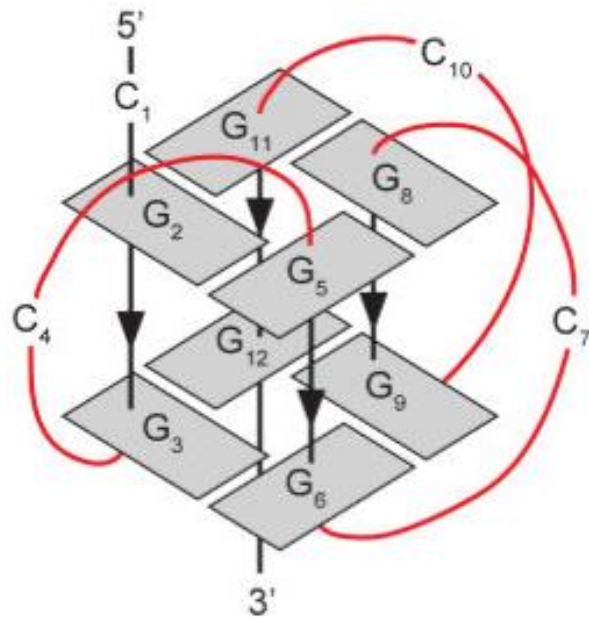


Рис. 1. Модель G-квадруплекса довжиною 12 нуклеотидів, що утворено двома G-тетрадами, з мотивом 5'-(CGG)₄-3' [19].

квадруплексів QGRS Mapper на веб-сервері <http://quadruplex.ramapo.edu/qgrs/app/start> [22, 23] за наступних параметрів: максимальна довжина G-квадруплекса — 45 н., мінімальний розмір G-групи — 2, петля — від 0 до 20 н.

Результати роботи. В якості контролю коректності пошуку G4-мотивів використовували послідовності, які утворюють G-квадруплекси, що експериментально підтверджено для низки вірусів та встановлено для транскриптому рослин — *Arabidopsis thaliana* (арабідопсис Талія) та рису. Для таких послідовностей, зокрема, для вірусу Ебола [24] розраховано G-рахунок, який становить 33 (табл. 1). Для експериментально визначених G4 *in vitro* та *in vivo* в РНК *Arabidopsis* [25] (AT4G30460 в табл. 1) значення G-рахунка становило 33.

Таблиця 1 — G-квадруплекси, які експериментально визначено та використано в якості контролю. Підкреслено G-мотиви в структурі G-квадруплексів

Назва	Довжина, н.	Мотив G-квадруплекса	G-рахунок
AT4G30460	14	<u>GGuGGaGGauauGG</u> [25]	33
Мотив(CGG) ₄	11	<u>CGGCGGCGGCGG</u> [19]	24
Ген L вірусу Ебола	23	<u>GGucauauGGgagGGauugaaGG</u> [24]	33
Вірус Зіка	20	<u>GGAGUGGGAAAGCGGAGCUGG</u> [26]	36
Вірус Зіка	11	<u>GGGGGUGGGGG</u> [26]	36
Вірус Зіка	13	<u>GGUGGGGGAUUGG</u> [26]	34
Вірус Зіка	19	<u>GGUAUGGGGGAGGACUGG</u> [26]	35
Вірус грипу H1N1	25	<u>GGGAAGGAAGUGCUUGUAAUUUGG</u> [27]	21
Вірус грипу H1N1	27	<u>GGGAAGGAAGUGCUUGUAAUUUGGGG</u> [27]	21
Вірус грипу H1N1	23	<u>GGGGCAUUUCCGAGGGUGACGG</u> [27]	26
Вірус грипу H1N1	21	<u>GGGUAGGGACAAUGGUGAUGG</u> [27]	35

Беручи до уваги також експериментальні дані щодо параметрів виявлених G4 в вірусах Зіка та грипу (табл. 1), в геномі ізолятів BI VPX аналізували тільки консервативні фрагменти, які можуть утворювати G-квадруплекси, G-рахунок яких знаходився в діапазоні 32–36.

В роботі [28] авторами на підставі аналізу тільки одного ізоляту BI VPX (NC_001413) виявлено 4 фрагменти, що можуть утворювати G4 (табл. 2). Зокрема, в гені *env* (BIV, 7991-8002) ідентифіковано збагачений гуаніном фрагмент з потенціалом утворення G-квадруплекса з чотирьох G-дімерів, для якого розрахований авторами G-рахунок становить 34. Проте не є можливим побудувати модель цього G4, оскільки розмір петлі має складати 1–12 нуклеотидів та більше, в той час як в зазначеному фрагменті два G-дімери (7991-7994) з'єднано безпосередньо один з одним. Доречі, програма для аналізу квадруплексів QGRS Mapper не ідентифікує цей мотив в гені *env* (BIV, 7991-8002) (табл. 2) як G4.

В той же час додатково до виявлених в роботі [28] мотивів потенційних G4 в геномній РНК BI VPX нами ідентифіковано 20 консервативних мотивів G-квадруплексів, G-рахунок яких становить 33–36 (табл. 2).

Крім того, показано, що два фрагменти з потенційними G4, які раніше в роботі [28] ідентифіковано тільки для 3'U5 LTR (положення 8423-8440 та 8455-8480), є прямими повторами та локалізовано також в 5'R5 LTR (положення 52-69 та 84-109).

Визначено, що кластери G-квадруплексів містять 2 G4 в гені *gag*, 9 G4 в гені *pol*, 3 G4 в гені *env*, 4 G4 в гені *rev*, 4 G4 утворено прямими повторами на 5'- та 3'-кінцях РНК та «+»-нитки провірусної ДНК. G4 нерівномірно розподілено по геному (рис. 2): для гена *env* щільність становила 2.6 G4 на 1000 н., для генів *tat*, *rev* — 2,7 G4 на 1000 н., найвищу щільність визначено для генів *tmx* (5.4 G4 на 1000 н.) та *pol* (2.8 G4 на 1000 н.), найменшу — для гена *gag* (1.4 G4 на 1000 н.), що збігається, зокрема, зі значенням щільності G4, яке знайдено для сегмента NP вірусу грипу H1N1 [27].

Таблиця 2 — Стабільні консервативні G-квадруплекси з максимальною довжиною до 45 н. для трьох ізолятів ВІ ВРХ (два з яких з повним геномом). Підкреслено дінуклеотиди, що утворюють G-квадруплекс. Положення на геномі наведено для ізоляту NC_001413.

Положення на геномі	Довжина, н.	Мотив G-квадруплекса	G-рахунок
5'R, 52-69	18	<u>GGCACTGGCTCGGTTGGG</u> (8423-8440)	35
5'R, 84-109	26	<u>GGtaataaaGGccttGtGGcattcGG</u> (8455-8480)	34
<i>gag</i> 612-	20	<u>GGCCCTAGGATATTGGGAGG</u>	33
<i>gag</i> 1519-	45	<u>GGTAGGAGATGTTACGGATGTGGGAAAACAGGACATTTGAAGAGG</u>	34
<i>pol</i> 1843-	26	<u>GGGATAGGATAAAAGGGTATCCAGGG</u>	33
<i>pol</i> 2078-	23	<u>GGTAAGGGGACCAGGGCCTAAGG</u>	36
<i>pol</i> 2642-	30	<u>GGAAATCAGGGATAAGTTAGGATCATATGG</u>	35
<i>pol</i> 3376-	37	<u>GGTGTGAAGGAAGGACTAAATCAAAGGTATTTCCAGG</u>	33
<i>pol</i> 3425-	39	<u>GGCGGAATTGAAGGCCATATGCATGGCTCTCTTGGATGG</u>	35
<i>pol</i> 3536-	19	<u>GGCCAGGGAAGGAATCTGG</u>	34
<i>pol</i> 4467-	14	<u>GGGGGAATAGGGG</u>	33
<i>pol</i> 4573-	37	<u>GGTGTACGTAAGGAACAGAAGAAAGGAATGGAAAGG</u>	33
<i>env</i> 5452-	10	<u>GGGGAGGAGG</u>	35
<i>env</i> 6127-	44	<u>GGGGAATGCTTTTGGGAAGAAATTGGCAGGTGGCTCGCACGTAGG</u>	34
<i>env</i> 6980-	42	<u>GGCCTCTGCCCGGTGGATTCTTGTAAGGTCCCAGCTATGG</u>	35
<i>env</i> 7175-	20	<u>GGCTAAGGTTGTGGAGAGGG</u>	36
<i>env, tat-rev, tmx, 7770-</i>	11	<u>GGAGGAGGAGG</u>	36
<i>env, tat-rev, tmx, 7739-</i>	24	<u>GGCGAGAGGAGACCCGGCTTCTGG</u>	35
<i>pol</i> 2088-	26	<u>GGCCACTGGGGTACCTTAGGCCCTGG*</u>	33
<i>env, tmx</i> 8094-	26	<u>GGGGCTTGGTATGAAGGCCTGAGAGG</u>	34
5'R; 3'U5	18	<u>GGCACTGGCTCGGTTGGG</u> (52-69; 8423-8440)	35
5'R; 3'U5	24	<u>GGTAATAAAGGCTTGGGCATTCGG</u> (84-109; 8455-8480)	34
<i>env</i>	12	<u>GGGGCaGGgtGG</u> (7991-8002) [28]	34
<i>env</i> NC_001413	26	<u>GGggcttGGtatgaaGGcctgagaaGG</u> (8079-8110) [28]	34
3'U5	18	<u>GGcactGGctCGGttgGG</u> (8423-8440) [28]	35
3'U5	26	<u>GGtaataaaGGccttGtGGcattcGG</u> (8455-8480) [28]	34

* — для «-»-нитки ДНК.

Геномна організація ВІ ВРХ є найскладнішою серед лентівірусів через наявність численних коротких відкритих рамок зчитування (open reading frames, ORFs) між генами *pol* та *env*, які перекриваються, що веде до присутності в клітинах, інфікованих ВІ ВРХ, несплайсованої, однократно та багатократно сплайсованих субгеномних вірусних молекул РНК.

З шести допоміжних та неструктурних регуляторних генів в геномі ВІ ВРХ гени *tat*, *rev*, *vif* та *tmx* можуть проявляти подібні властивості до Nef (Negative factor) ВІЛ [30]. Гени *vpr* та *vprw*, які містять подібний до *vif* мотив, є унікальними для лентівірусів і містяться тільки в геномі ВІ ВРХ. Інший допоміжний ген *tmx*, для якого ідентифіковано 3 G4, є унікальним для ВІ ВРХ та вірусу хвороби Джембрана (ВХД), який є близькоспорідненим до ВІ ВРХ. В огляді [15] зазначено, що функція гена *tmx*, який локалізовано на 3'-кінці гена *env* ВІ ВРХ та ВХД, станом на 2020 р. з посиланням на [31] від 2005 р., є невідомою. Більше того, для ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом в базі даних GenBank не зазначено наявності та положення гена *tmx*.

За допомогою множинного вирівнювання мРНК ізолятів ВІ ВРХ з геном *tmx* (довжиною 555 н.) ізоляту DQ156511 ВХД нами визначено положення гена *tmx*, в тому числі, для ізоляту NC_001413 ВІ ВРХ (7568-8122).

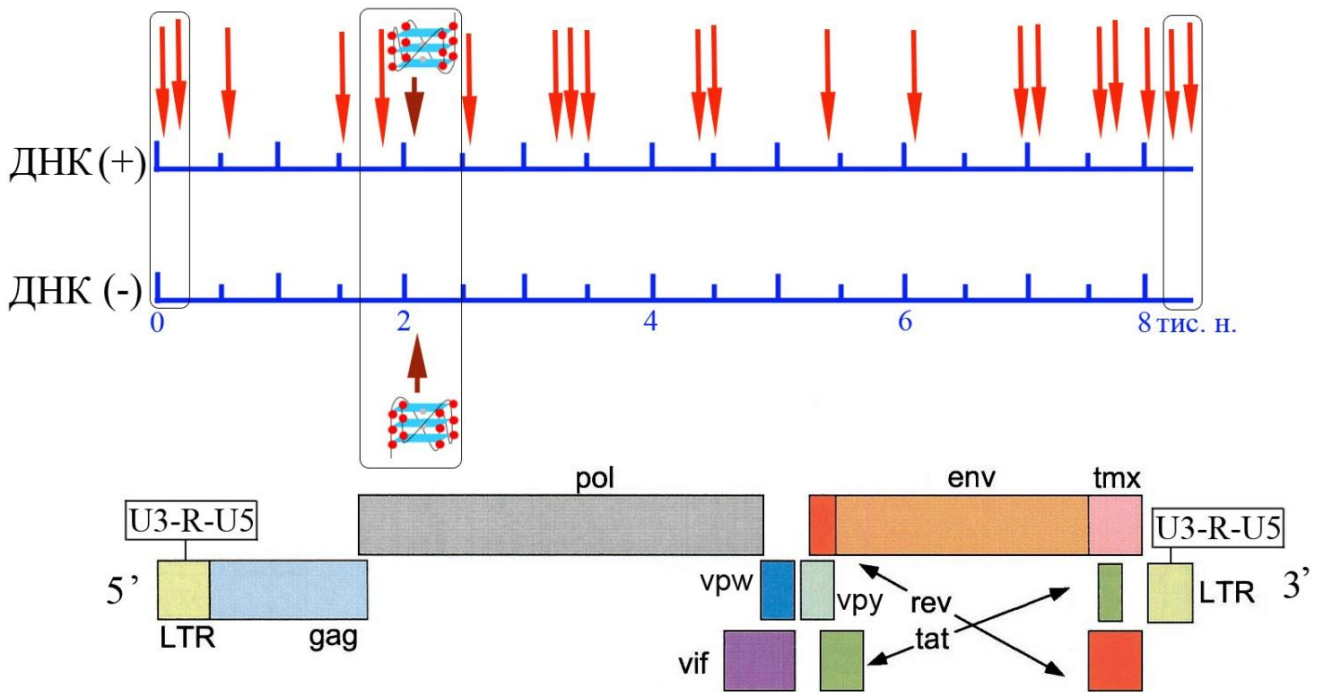


Рис. 2. Фізична карта геному вірусу імунодефіциту ВРХ з наведеними позиціями відомих генів [29]. Короткими стрілками в прямокутниках виділено G-квадруплєкси в «+»- та «-»-нитки провірусної ДНК. В прямокутниках також виділено G-квадруплєкси, що утворено прямими повторами на 5'- та 3'-кінцях РНК та «+»-нитки провірусної ДНК. Довгими стрілками показано позиції стабільних внутрішньомолекулярних консервативних G-квадруплєксів, G-рахунок яких становить 33–36.

Висновки. В роботі продемонстровано існування в геномній РНК, в плюс- та мінус-нитках провірусної ДНК ВІ ВРХ консервативних мотивів, які містять збагачені гуаніном фрагменти з потенціалом утворення G-квадруплєксів. Порівняння визначених параметрів — G-рахунків — для відомих з літературних даних еспериментально визначених G4 для низки вірусів та для ВІ ВРХ показує, що G-рахунок для потенційних квадруплєксів в геномі ВІ ВРХ (33–36) за порядком величини збігається з G-рахунком для вірусів Ебола, Зіка, грипу Н1Н1. Важливо здійснювати пошук G4 не тільки для «+»-нитки, а й в послідовності «-»-нитки провірусної ДНК, що дозволяє додатково виявляти інші G4, які відсутні в «+»-нитці.

Перспективи використання отриманих результатів. Створення діаграми розподілу на геномі ВІ ВРХ не тільки потенційних консервативних G-квадруплєксів поряд з шпильковими, 3WJ (three way junctions) структурами дозволить отримати додаткову інформацію щодо неканонічних елементів, які регулюють функціонування геному ВІ ВРХ.

Поява нещодавно нових численних алгоритмів з новими підходами до пошуку неканонічних структур дозволить проводити передбачення G-квадруплєксів у геномі патогенів точніше та надійніше.

Фінансування. Роботу виконано за фінансової підтримки гранта 34.02.01.01Ф Національної академії аграрних наук України.

Список літератури

1. Rhodes D., Lipps H. J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic acids research*. 2015. Vol. 43, No 18. P. 8627–8637. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv862>.
2. Puig Lombardi E., Londoño-Vallejo A. A guide to computational methods for G-quadruplex prediction. *Nucleic acids research*. 2020. Vol. 48, No 1. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1097>.
3. Chung W. C., Ravichandran S., Park D., Lee G. M., Kim Y. E., Choi Y., Song M. J., Kim K. K., Ahn J. H. G-quadruplexes formed by Varicella-Zoster virus reiteration sequences suppress expression of glycoprotein C and regulate viral cell-to-cell spread. *PLoS pathogens*. 2023. Vol. 19, No 1. P. e1011095. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011095>.

4. Dumas L., Herviou P., Dassi E., Cammas A., Millevoi S. G-Quadruplexes in RNA Biology: Recent Advances and Future Directions. *Trends in biochemical sciences*. 2021. Vol. 46, No 4. P. 270–283. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.11.001>.
5. Cagirici H. B., Sen T. Z. Genome-Wide Discovery of G-Quadruplexes in Wheat: Distribution and Putative Functional Roles. *G3 (Bethesda, Md.)*. 2020. Vol. 10, No 6. P. 2021–2032. DOI: <https://doi.org/10.1534/g3.120.401288>.
6. Abiri A., Lavigne M., Rezaei M., Nikzad S., Zare P., Mergny J. L., Rahimi H. R. Unlocking G-Quadruplexes as Antiviral Targets. *Pharmacological reviews*. 2021. Vol. 73, No 3. P. 897–923. DOI: <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000230>.
7. Huppert J. L., Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic acids research*. 2005. Vol. 33, No 9. P. 2908–2916. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki609>.
8. Stefos G. C., Theodorou G., Politis I. DNA G-quadruplexes: functional significance in plant and farm animal science. *Animal Biotechnology*. 2021. Vol. 32, No 2. P. 262–271. DOI: <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1679823>.
9. Bugaut A., Balasubramanian S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Research*. 2005. Vol. 33, No 9. P. 2908–2916. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks068>.
10. Prister L. L., Yin S., Cahoon L. A., Seifert H. S. Altering the *Neisseria gonorrhoeae pilE* guanine quadruplex loopbases affects pilin antigenic variation. *Biochemistry*. 2020. Vol. 59, No 10. P. 1104–1112. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b01038>.
11. Harris L. M., Merrick C. J. G-quadruplexes in pathogens: a common role to virulence control. *PLoS Pathogene*. 2015. Vol. 11, No 2. P. e1004562. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004562>.
12. Kong J. N., Zhang C., Zhu Y. C., Zhong K., Wang J., Chu B. B., Yang G. Y. Identification and characterization of G-quadruplex formation within the EP0 promoter of pseudorabies virus. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, No 1. P. 14029–14041. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32222-7>.
13. Li Y., Zhu Y., Wang Y., Feng Y., Li D., Li S., Qin P., Yang X., Chen L., Zhao J., Zhang C., Li Y. Characterization of RNA G-quadruplexes in porcine epidemic diarrhea virus genome and antiviral activity of G-quadruplex ligands. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Vol. 231. P. 123282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123282>.
14. Muturi E., Meng F., Liu H., Jiang M., Wei H., Yang H. Comprehensive analysis of G-quadruplexes in African swine fever virus genome reveals potential antiviral targets by G-quadruplex stabilizers. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. P. 798431. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.798431>.
15. Munis A. M. Gene therapy applications of non-human lentiviral vectors. *Viruses*. 2020. Vol. 12, No 10. P. 1106. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12101106>.
16. Лиманська О. Ю. Молекулярні технології в типуванні та детекції патогенів бактеріальної і вірусної природи : автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Київ, 2011. 45 с.
17. Лиманская О. Ю., Лиманский А. П. Распределение потенциальных шпильчатых структур в геноме ретровирусов крупного рогатого скота. *Вопросы вирусологии*. 2009. Т. 54, № 4. С. 27–32.
18. Лиманська О. Ю. Поліпуринові/поліпіримідинові послідовності з потенціалом утворення триплексів в провірусній ДНК ретровірусів великої рогатої худоби. *Цитологія та генетика*. 2010. Т. 44, № 1. С. 10–18.
19. Wolfe A. L., Singh K., Zhong Y., Drewe P., Rajasekhar V. K., Sanghvi V. R., Mavrakis K. J., Jiang M., Roderick J. E., Van der Meulen J., Schatz J. H., Rodrigo C. M., Zhao C., Rondou P., de Stanchina E., Teruya-Feldstein J., Kelliher M. A., Speleman F., Porco J. A., Jr, Pelletier J., ... Wendel H. G. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*. 2014. Vol. 513, No 7516. P. 65–70. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13485>.
20. Hal T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
21. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. Vol. 30, No 12. P. 2725–2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
22. Menendez C., Frees S., Bagga P. S. QGRS-H Predictor: a web server for predicting homologous quadruplex forming G-rich sequence motifs in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40. P. W96–W103. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks422>.
23. Kikin O., D'Antonio L., Bagga P. S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*. 2006. Vol. 34. P. W676–W682. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl253>.
24. Wang S. R., Zhang Q. Y., Wang J. Q., Ge X. Y., Song Y. Y., Wang Y. F., Li X. D., Fu B. S., Xu G. H., Shu B., Gong P., Zhang B., Tian T., Zhou X. Chemical targeting of a G-quadruplex RNA in the Ebola virus L gene. *Cell Chemical Biology*. 2016. Vol. 23, No 9. P. 1113–1122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.07.019>.
25. Yang X., Cheema J., Zhang Y., Deng H., Duncan S., Umar M. I., Zhao J., Liu Q., Cao X., Kwok C. K., Ding Y. RNA G-quadruplex structures exist and function in vivo in plants. *Genome Biology*. 2020. Vol. 21. P. 226. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02142-9>.
26. Majee P., Pattnaik A., Sahoo B. R., Shankar U., Pattnaik A. K., Kumar A., Nayak D. Inhibition of Zika virus replication by G-quadruplex-binding ligands. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*. 2021. Vol. 23. P. 691–701. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.12.030>.
27. Brázda V., Porubiaková O., Cantara A., Bohálová N., Coufal J., Bartas M., Fojta M., Mergny J. L. G-quadruplexes in H1N1 influenza genomes. *BMC Genomics*. 2021. Vol. 22. P. 77. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07377-9>.
28. Perrone R., Lavezzo E., Palù G., Richter S. N. Conserved presence of G-quadruplex forming sequences in the long terminal repeat promoter of lentiviruses. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, No 1. P. 2018–2028. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02291-1>.

29. Berkowitz R., Ilves H., Lin W. Y., Eckert K., Coward A., Tamaki S., Veres G., Plavec I. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 2001. Vol. 75, No 7. P. 3371–3382. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3371-3382.2001>.
30. de Pablo-Maiso L., Doménech A., Echeverría I., Gómez-Arrebola C., de Andrés D., Rosati S., Gómez-Lucía E., Reina R. Prospects in innate immune responses as potential control strategies against non-primate lentiviruses. *Viruses*. 2018. Vol. 10, No 8. P. 435. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10080435>.
31. St-Louis M. C., Cojocariu M., Archambault D. The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses. *Animal Health Research Reviews*. 2004. Vol. 5, No 2. P. 125–143. DOI: <https://doi.org/10.1079/ahr200496>.

IDENTIFICATION OF CONSERVED G-QUADRUPLEX MOTIFS IN THE GENOME OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

Balak O. K.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Lymanska O. Yu.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Guanine-rich DNA and RNA fragments tend to form stable noncanonical secondary structures — G-quadruplexes (G4) — which can be of different topologies (monomolecular, interstranded bimolecular, interstranded tetramolecular). Canonical G4s contain 2-4 G-tetrads, which are stabilized by stacking interactions, Hoogsteen hydrogen bonds and connected by a loop of 1-12 nucleotides. Based on the analysis of the nucleotide sequence, conservative G-quadruplexes that can be formed in genomic RNA and proviral DNA of the bovine immunodeficiency virus (BIV) were determined. In addition to the known potential G4 in the 3'LTR of BIV RNA, 20 stable conservative motifs of G-quadruplexes were identified for the «+» strand of the RNA, as well as for the «-» strand sequence of the proviral DNA, which G-score value (a relative parameter that characterizes stability G4) varies from 33 to 36. Two fragments with potential G4 previously identified only for the 3'U5 LTR were shown to be direct repeats and localized also in the 5'R5 LTR. A localization map of potentially stable conservative intramolecular G-quadruplexes formed by two G-tetrads was created on the BIV genome. G4 is unevenly distributed throughout the genome: for the env gene, the density was 2.6 G4 per 1000 nt., for the tat-rev gene — 2.7 G4 per 1000 nt., the highest density values were determined for the tmx (5.4 G4 per 1000 nt.) and pol genes (2.8 G4 per 1000 nt.), the lowest for gag gene (1.4 G4 per 1000 nt.). The importance of G4 search in the sequence of the minus strand of proviral DNA, in which one G4 was identified, was proved

Keywords: bovine immunodeficiency virus (BIV), G-quadruplex, noncanonical structure

УДК 619:616.98:578.828.5.083.224:578.2'21:636.22/.28

DOI [10.36016/VM-2024-110-11](https://doi.org/10.36016/VM-2024-110-11)

ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА СПУМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ВРХ НА КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОМУ РІВНІ

**Горбатенко С. К., Дідик Т. Б., Корнєйкова О. Б.,
Кузнецова О. В., Мягих Н. В., Бриль Н. Ф.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: st.gorbatenko@gmail.com*

Дунаєва О. В.

Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

*Вивчали адаптаційну можливість спумавірусу до гомологічних перещеплюваних культур клітин, а саме ЛЕК і КСТ. В процесі інтеграції збудника спумавірусної інфекції ВРХ в перещеплювані культури клітин ЛЕК та КСТ спостерігаються морфологічні зміни стану моношару за принципом синцитійутворення та вакуолізації. Встановлено, що перещеплювана культура клітин ЛЕК більш придатна для реплікації збудника та накопичення вірусної маси. Дослідження щодо можливості інтеграції польової форми спумавірусу в перещеплювану культуру клітин КСТ показали низьку чутливість останньої до вірусу сімейства *Retroviridae**