

KONFORMAČNÍ VLASTNOSTI A PRODLUŽOVÁNÍ MOLEKUL DNA OBSAHUJÍCÍCH TANDEMOVÁ OPAKOVÁNÍ TRIPLETŮ ZAČÍNAJÍCÍCH CYTOSINEM A KONČÍCÍCH GUANINEM

JAROSLAV KYPR a MICHAELA VORLÍČKOVÁ

Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Královopolská 135, Brno, E-mail: mjfi@ibp.cz.

Došlo dne 25.II.1977

Obsah

1. Úvod
2. Intrařetězcové vlásenky, bimolekulární homoduplexy a kvadruplexy mikrosatelitů (CNG)_n
3. Duplexy vzniklé asociací komplementárních řetězců
4. Interakce s proteiny, replikace a prodlužování mikrosatelitů (CNG)_n
5. Závěr

1. Úvod

V genomech člověka a řady dalších organismů se v překvapivě hojném počtu vyskytují tandemová opakování velmi krátkých nukleotidových motivů¹, která se nazývají mikrosatelity. Tyto úseky genomové DNA jsou délkově polymorfní, tj. jejich délka se u jednotlivých individuí téhož druhu často liší². Přitom ale rozložení mikrosatelitů je v genomech konzervativní³, což svědčí o jejich funkční významnosti. Pro své specifické vlastnosti jsou mikrosatelity vhodným nástrojem mapování genomů i analýz v populační genetice. Hlavní pozornost však přitahují díky tomu, že v některých případech jejich prodloužení nad kritickou hranici vede k závažným, zejména neurodegenerativním onemocněním. Tyto patologické projevy byly zatím pozorovány u mikrosatelitů⁴ s opakující se jednotkou CTG (v komplementárním řetězci CAG) a CCG (v komplementárním řetězci CGG), ale podobné lékařsky významné vlastnosti lze očekávat (a už se objevují) i u jiných mikrosatelitů⁵. Naše laboratoř studuje^{6,9} vlastnosti mode-

lových molekul DNA, které obsahují mikrosatelitní nukleotidové posloupnosti, od konce sedmdesátých let, kdy ještě nebyl znám ani jejich častý výskyt v genomech. Zobecněným poznatkem vyplývajícím z těchto studií je fakt, že mikrosatelity vnášejí do DNA výraznou konformační polymorfii, tj. schopnost nabývat kromě klasické dvoušroubovice ještě řady jiných sekundárních, případně terciárních struktur⁶⁻⁹. Nyní se ukazuje, že tato konformační polymorfie asi stojí v pozadí prodlužování mikrosatelitů a může tedy být primární příčinou výše uvedených onemocnění^{10,11}. V tomto článku předkládáme přehled o konformační polymorfii DNA obsahujících tandemová opakování trinukleotidů CNG, jejich interakcí s proteiny a prodlužování při replikaci. Z jiných pohledů, zejména medicínských, byla tato problematika nedávno shrnuta v několika článcích^{4,10-13}.

2. Intrařetězcové vlásenky, bimolekulární homoduplexy a kvadruplexy jednotlivých řetězců (CNG)_n

Jednotlivé řetězce DNA (tj. oddělené od svého komplementu) by podle klasických představ většinou měly zaujmout neuspořádanou konformaci. Výjimkou jsou autokomplementární sekvence, např. CGCGAATTCGCG, které samy se sebou asociují do duplexů Watsonova-Crickova typu. Navíc tvoří vlásenky, v nichž se několik centrálních bází nachází ve smyčce na jedné straně duplexu. Vlásenky a duplexy mohou být však v některých případech tvořeny i neautokomplementárními sekvencemi, protože selektivita párování A s T ani C s G není zdaleka tak vysoká jak se traduje v učebnicích. Příkladem jsou struktury fragmentů DNA obsahujících tandemová opakování trinukleotidů CNG.

Nejčastěji se o souvislosti prodlužování mikrosatelitů se závažnými genetickými chorobami hovoří v případě mikrosatelitů (CAG)_n-(CTG)_n. Mariappan a spol. ukázali¹⁴ pomocí NMR a gelové elektroforézy, že fragmenty (CTG)₅ a (CTG)₆ tvoří intrařetězcové vlásenky v roztoku, které jsou stabilní vůči variačním iontové síly v rozmezí 10–200 mM-NaCl, dále vůči koncentraci řetězců DNA v rozmezí mi-

kromolárních až milimolárních hodnot a pH v rozmezí 6,0-7,5. Vlásaenka obsahuje ve smyčce tři báze, je-li počet trinukleotidových opakování lichý, a čtyři, je-li tento počet sudý. Nezávisle na počtu bází ve smyčce obsahuje stoněk vlásaenky páry TT spojené dvěma vodíkovými vazbami. Všechny nukleotidové zbytky se nacházejí v běžné konformaci C2'-endo, *anti*.

Mitas a spol. studovali¹⁵ 45-mer (CTG)₁₅ pomocí elektroforézy, štěpení nukleasou P1 a oxidace bází prostřednictvím KMnO₄. Tento řetězec DNA také tvoří jednořetězcovou vlásaenku, v jehož stonku jsou tyminové zbytky zahrnuté ve dvojité šroubovici. Tadaž laboratoř dále ukázala¹⁶, že 45-mer (GTC)₁₅ tvoří trochu méně stabilní a v detailech odlišnou, ale v podstatě podobnou vlásaenku. Ke stejnému závěru tito autoři dospěli¹⁷ při srovnání vlásaenek tvořených (CAG)₁₅ a (GAC)₁₅. nomén je indukovan (stejně jako tvorba tetraplexu) přítomností draselných iontů a tato indukce je usnadněna²⁶ v případě mírně kyselých hodnot pH.

Petruska a spol. podobně srovnávali¹⁸ (CAG)₁₀, (CTG)₁₀, (GAC)₁₀, (GTC)₁₀, (CAG)₃₀ a (CTG)₃₀. Ukázalo se, že termostabilita jejich vlásaenek není vyšší u trojnásobně prodloužených opakování motivů CTG nebo CAG. Přítom nejstabilnější vlásaenky tvoří motiv CTG a nejméně stabilní motiv GTC, což plyne i ze studie provedené Smithem a spol.¹⁹ Mezi GAC a CAG není v tomto ohledu znatelný rozdíl. Vlásaenkovými strukturami trinukleotidových opakování se zabývali²⁰ též Gacy a spol., kteří zjistili, že jejich termostabilita závisí na okolních sekvencích. Tito autoři se dále domnívají, že tvorba vlásaenky vysvětluje, proč přerušení tripletu AGG zamezuje prodloužování mikrosatelitu (CGG)_n.

Chen a spol. studovali²¹ tvorbu vlásaenek u (GGC)₅, (GCC)₅ a (GCC)₆. Všechny tyto řetězce DNA tvoří vlásaenky za „fyziologických podmínek“. K tomu jsou náchylnější řetězce bohatější na cytosin. Vlásaenky tvořené těmito řetězci obsahují nekanonické páry CC zahrnující cytosinové zbytky v dinukleotidu CpG, které jsou často methylovány. Páry CC zvyšují v místě dinukleotidu CpG flexibilitu, která potencuje metylaci. Tedy tvorba vlásaenky by mohla vysvětlovat specifickou metylaci řetězce (CCG)_n, ke které dochází na počátku nemoci. Výsledkem této methylace je inaktivace příslušného genu FMR-1.

Studie téže laboratoře pomocí NMR spektroskopie ukázaly²², že (GCC)₅₋₇ tvoří v širokém rozmezí podmínek (10-150 mM-NaCl, pH 6-7) výlučně vlásaenky s přečnávajícím C na konci 3'. V nich je maximalizován počet párů GC. Stonky vlásaenek obsahují nekanonické páry CC v dinukleotidech CpG a všechny nukleotidové zbytky mají běžnou konformaci C2'-endo, *anti*. Na rozdíl od (GCC)_n, komplementární řetězce (GGC)_n mají menší tendence ke

tvorbě vlásaenek a tvoří dvouřetězcové duplexy stejně ochotně jako jednořetězcové vlásaenky. Při vysokých koncentracích potřebných pro měření NMR duplexy výrazně převládají. Tyto duplexy obsahují kanonické páry GC a dále páry GG, v nichž jeden G se nachází v obvyklé orientaci *anti* vůči svému cukernému zbytku, druhý v méně obvyklé orientaci *syn*. Stejný typ páru GG pozorovali²³ Mitas a spol. ve vlásaence tvořené řetězcem (CGG)₁₅. Řetězce (CGG)_n navíc asociují do kvadruplexů obsahujících guaninové tetrády²⁴, které jsou zejména stabilní v případě, že cytosin je methylován v poloze 5. U komplementárních řetězců (CCG)_n nebyly tyto kvadruplexy pozorovány. Tvorba kvadruplexu může zabránit jak transkripci tak replikaci příslušného genu. Inhibice replikace tetraplexem mikrosatelitu (CGG)_n byla již experimentálně pozorována²⁵. Tento fenomen je indukovan (stejně jako tvorba tetraplexu) přítomností draselných iontů a tato indukce je usnadněna²⁶ v případě mírně kyselých hodnot pH.

3. Duplexy vzniklé asociací komplementárních řetězců

Z výše uvedeného plyne, že jen (CGG)_n výrazněji asociuje do bimolekulárních homoduplexů. Ostatní, tj. (CCG)_n, (CAG)_n a (CTG)_n v nepřítomnosti komplementárního řetězce spíše tvoří jednořetězcové vlásaenky. Toto tvrzení ale samozřejmě nelze chápat jako absolutní, protože významnou úlohu při rozhodování o převládajícím konformeru nehraje jen posloupnost bází v řetězci DNA, ale také např. délka molekuly. Pro krátké řetězce (CCG)₂, případně (CCG)₃, které jsou jako většina krátkých fragmentů DNA ve vlásaenkové konformaci málo stabilní, byla pozorována²⁷ pozoruhodná homoduplexová konformace stabilizovaná extrahelikálními cytosiny. V této souvislosti je zajímavé, že methylace cytosinu methyltransferasami zahrnuje jeho vysunutí z vnitřku dvojité šroubovice do extrahelikální polohy²⁸. Navzdory tendenci tvořit intrařetězcové vlásaenky, které jsou stabilnější v případě sekvencí (CNG)_n než u běžných sekvencí, v přítomnosti komplementárního řetězce vlásaenka zaniká a vytváří se bimolekulární heteroduplex. Asociace komplementárních řetězců probíhá překvapivě snadno, přinejmenším u fragmentů (CNG)_n testovaných v naší laboratoři²⁹. Není ani třeba použít „annealing“ (zahřátí na vysokou teplotu a pomalé zchlazení), který je v případě řady běžných sekvencí nutný k úplné asociaci komplementárních řetězců DNA. Nekomplementární sekvence (CNG)_n spolu naopak vůbec

neinteragují²⁹. $(CNG)_n$ tedy tvoří duplex s komplementární sekvencí daleko ochotněji než intrařetězcové konformace. Např. heteroduplex $(CAG)_3 \cdot (CTG)_3$ je mnohem stabilnější¹⁹ než homoduplexy tvořené $(CTG)_3$ nebo $(CAG)_3$. Přesto za některých okolností mohou úseky $(CNG)_n$ tvořit vlásenky *in vivo*³⁰. Dalším faktorem ovlivňujícím konformaci trinukleotidových opakování v DNA jsou ionty. Bylo ukázáno³¹, že v přítomnosti zinečnatých nebo kobaltnatých iontů nabývá trinukleotid AGC, ale nikoli CAG nebo GCA, neobvyklé konformace v duplexu se svým komplementem. V ní jsou cytosiny nespárovány.

Zajímavou otázkou zůstává, zda heteroduplexy $(CAG)_n \cdot (CTG)_n$ a $(CCG)_n \cdot (CGG)_n$, v nichž jsou sekvence bází komplementární tak, jak to vyžaduje klasický model DNA, skutečně tvoří dvoušroubovici Watsona a Cricka. Kupodivu dosud známé údaje tomu nenasvědčují. Tyto duplexy jsou totiž kompaktnější³² než kontrolní stejně dlouhé duplexy obsahující tandemová opakování tripletů odlišných od CNG. Migrují v gelech rychleji³³ než odpovídá jejich molekulové hmotnosti, zatímco např. ohyby DNA naopak vedou ke zpomalené migraci. Je také pozoruhodné, že zrychlení migrace v gelu roste³² s počtem opakování trinukleotidů CNG, přičemž u jiných trinukleotidových opakování bohatých na G+C není toto zrychlení pozorováno. Další studie ukazují³⁴, že řetězec $(CAG)_n$ je i v duplexu s $(CTG)_n$ citlivý k nukleaze specificky štěpící jednořetězcovou DNA.

4. Interakce s proteiny, replikace a prodlužování mikrosatelitů $(CNG)_n$

Konformační vlastnosti DNA jsou pro její fungování v buňce určitě mnohem důležitější než se dosud většinou bralo v úvahu. Nicméně k prodlužování mikrosatelitů dochází až teprve v průběhu molekulárně biologických dějů, při nichž DNA interaguje s proteiny³⁵. Přinejmenším z hlediska četnosti dominují v buňkách interakce s histony, které tvoří společně s DNA základní jednotku chromozomů, tzv. nukleozomy. Experimenty ukázaly³⁶, že přítomnost tandemových opakování $(CAG)_n \cdot (CTG)_n$ tvorbu nukleozomů zesilují, čímž je potlačována transkripce. V tomto ohledu tedy úseky $(CAG)_n \cdot (CTG)_n$, které se často nacházejí v blízkosti počátku genů, působí jako represory jejich transkripce. V další studii³⁷ bylo ukázáno, že krátká opakování trinukleotidu CTG se nacházejí v přirozených sekvencích, které tvoří nukleozomy nejsnadněji. Šest opakování CTG ale již potencuje tvorbu nukleozomů jako padesát opakování

CTG, která se nacházejí v některých patologicky pozmeněných genech.

Neobvyklé struktury DNA jsou v řadě případů pro vázány vznikem jednořetězcových úseků, na které se vážou specifické proteiny. Tím jsou tyto neobvyklé struktury stabilizovány. V extraktech buněk myšlího mozku byly detegovány³⁸ dva proteiny mající molekulovou hmotnost 40 kDa a 44 kDa, které se specificky váží k jednořetězcové $(AGC)_n$. V jiných tkáních se vyskytují buďto velice málo nebo vůbec. Tyto proteiny byly vyčištěny a pojmenovány TRIP-1 a TRIP-2. Ukázalo se, že se váží k motivům $(AGC)_n$, $(AGT)_n$, $(GGC)_n$ a $(GGT)_n$, ale ne k ostatním motivům. Pro rozpoznání a vazbu TRIP-1 a TRIP-2 je třeba minimálně 8 opakování trinukleotidu AGC. Koncentrace proteinu TRIP-1 a TRIP-2 v mozku roste po narození a dosahuje stabilní hodnoty asi po třech týdnech. Dále se ukázalo³⁹, že v *E. coli* v nepřítomnosti proteinu navazujícího se na jednořetězcovou DNA dochází ke zvýšení frekvence delecí uvnitř tandemových opakování $(CTG)_n \cdot (CAG)_n$.

Úsek $(CAG)_{30}$ je rozpoznáván⁴⁰ proteinem SRY, který determinuje pohlaví. Gen kódující protein SRY je lokalizován na chromozomu Y v oblasti, která kromě dalších mikrosatelitů obsahuje i úsek $(CAG)_{30}$. Vazbou na mikrosatelit $(CAG)_{41}$ může protein SRY ovlivňovat děje předcházející diferenciaci varlat. Protein SRY se váže k DNA prostřednictvím domény, kterou obsahují i nehistonové proteiny typu HMG. Ty interagují⁴¹ s víceřetězcovými strukturami, které se tvoří po asociaci $(GCC)_{15}$ s $(GCC)_{10}$. Tyto víceřetězcové struktury se netvoří při asociaci $(GCC)_{15}$ s $(GCC)_{15}$.

Kang a spol. ukázali⁴², že frekvence expanzí nebo delecí $(CTG)_n \cdot (CAG)_n$ v *E. coli* jsou větší v oblastech vzdálených od replikačního počátku. Přitom rozsáhlé expanze nevznikají kumulací efektem malých expanzí, ale dochází k nim naráz⁴³. Popsaná pozorování nelze vysvětlit defekty v reparačním systému buňky. Spíše jsou důsledkem neobvyklých struktur DNA vedoucích k prodlužování komplementárních řetězců. Další práce z téže laboratoře ukázala⁴⁴, že mikrosatelity $(CTG)_n \cdot (CAG)_n$ i $(CCG)_n \cdot (CGG)_n$ pocházející z patologicky pozmeněných lidských genů vedou k replikačním bariérám *in vitro*. K podobnému závěru dospěly i další studie^{25,45-46}. Ve všech se jako nejpravděpodobnější důvod jeví neobvyklé konformace DNA v oblasti tandemových opakování trinukleotidových motivů. Přitom ale i jednotlivé polymerasy se liší v rozsahu, ve kterém při replikaci expandují mikrosatelity⁴⁷. Z testovaných polymeras (Taq, Klenow, Sequenase, a HIV RT) prodlužuje mikrosatelit $(GGC)_n \cdot (GCC)_n$ nejvíce Taq, přičemž prodlu-

žování se zdá být procesem asymetrickým z hlediska jednotlivých řetězců. V případě mikrosatelitu $(GGC)_n$, $(GCC)_n$ se jako aktivní zdroj prodlužování zdá být řetězec $(GCC)_n$, zatímco řetězec $(GGC)_n$ je prodlužován pasivně v důsledku prodloužení řetězce $(GCC)_n$. Prodlužování vykazují i některé oligonukleotidy při běžné PCR bez přítomnosti jakékoli přirozené DNA⁴⁸. Mezi prodlužované oligonukleotidy patří $(CGG)_{17}$, $(CGG)_{12}$, $(GCC)_{17}$, $(CG)_{25}$, $(CTG)_{17}$ nebo směs $(CAG)_{17}$ plus $(GTC)_{17}$. Jejich prodloužení je patrné již po čtyřech replikačních cyklech. Klenowův fragment prodlužuje tyto fragmenty i bez teplotního cyklování. Jiné oligonukleotidy, např. $(CGG)_7$, $(CGGT)_{13}$ nebo $(TAA)_{17}$ se při analogických experimentech neprodužují⁴⁸. Methylace cytidinu v $(GCC)_{17}$ nebo $(CG)_{25}$ expanzi výrazně redukuje.

5. Závěr

Tento přehled dokumentuje, že při replikaci tandemových opakování trinukleotidů CNG dochází k prodlužování molekul DNA. Současně se ukazuje, že tandemová opakování těchto trinukleotidů, podobně jako mnohé další mikrosatelity, se odlišují od ostatní DNA tím, že nabývají zvláštních konformací, což může být primární příčinou jejich prodlužování. Tandemová opakování CNG tvoří stabilní intrařetězcové vlásenky a bimolekulární homoduplexy, přičemž řetězce $(CGG)_n$ navíc ještě asociují do tetraplexů. V těchto konformerech se vyskytují nekanonické páry bází i báze vysunuté do extrahelikální polohy, což je situace, se kterou se setkáváme nejen při methylaci cytosinu methyltransferasami ale i při reparaci poškození DNA různými enzymy⁴⁹.

Navzdory schopnosti jednotlivých řetězců tvořit uspořádané struktury, v přítomnosti komplementárního řetězce (ale nikoli nekomplementárního²⁹) dochází k jejich překvapivě snadné asociaci. Vzniklé duplexy však migrují v gelech rychleji než bychom očekávali, což naznačuje, že v nich se možná v plném rozsahu neuplatňuje párování A s T a G s C.

Výše popsané jevy nabourávají některá paradigma molekulární biologie. Tím, jehož potlačení asi přinese největší posun v pochopení funkce, evoluce a patogeneze genomů, je představa DNA jako rigidního objektu, jehož jedinou zajímavou vlastností je kódování RNA a proteinů. DNA totiž ani zdaleka není jen lineární sled čtyř písmen, jak by se mohlo nezasvěcenému zdát při pohledu na výsledky sekvenčních studií. Naopak jde o gigantickou vlák-

nitou molekulu vykazující specifická a vzájemně propojená trojrozměrná uspořádání na různých úrovních složitosti. Navíc tato uspořádání nejsou statická a právě konformační polymorfie mikrosatelitů může být jedním z nástrojů umožňujících genomu specificky reagovat na vnější stimuly a také se vyvíjet v průběhu evoluce. Jak se nyní ukazuje, délková polymorfie mikrosatelitů bohužel způsobuje i některá závažná onemocnění. Nelze si než přát, aby výzkum co nejdříve umožnil proti těmto nemocem nalézt účinnou obranu.

Tato práce je podporována grantem reg. č. 204/95/1270, který M. Vorlíčkové udělila Grantová agentura ČR.

LITERATURA

1. Tautz D., Renz M.: *Nucleic Acids Res.* 12, 4127 (1984).
2. Tautz D.: *Nucleic Acids Res.* 17, 6463 (1989).
3. Blanquer-Maumont A., Crouau-Roy B.: *J. Mol. Evol.* 41, 492 (1995).
4. Ashley C. T., Jr., Warren S. T.: *Annu. Rev. Genetics* 29, 703 (1995).
5. Lindblad K., Zander C., Schalling M., Hudson T.: *Nature Genetics* 7, 124 (1994).
6. Vodičková M., Sklenář V., Kypr J.: *J. Mol. Biol.* 166, 85 (1983).
7. Vodičková M., Kypr J.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3, 67 (1985).
8. Vodičková M., Kypr J.: *Chem. Listy* 79, 501 (1985).
9. Kypr J., Vodičková M., v knize: *Structure and Expression: Nucleic Acids and Proteins*, sv. 2, (Sarma R. H., Sarma M. H., ed.), str. 105. Adenine Press, New York 1988.
10. Wells R. D.: *J. Biol. Chem.* 271, 2875 (1996).
11. McMurray C. T.: *Chromosoma* 104, 2 (1995).
12. Sutherland G. R., Richards R. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3636 (1995).
13. Singer R. H.: *Molecular Medicine Today* 1996, 65.
14. Mariappan S. V. S., Garcia A. E., Gupta G.: *Nucleic Acids Res.* 24, 775 (1996).
15. Mitas M., Yu A., Dill J., Kamp T. J., Chambers E. J., Haworth I. S.: *Nucleic Acids Res.* 23, 1050 (1995).
16. Yu A., Dill J., Wirth S. S., Huang G., Lee V. H., Haworth I. S., Mitas M.: *Nucleic Acids Res.* 23, 2706 (1995).
17. Yu A., Dill J., Mitas M.: *Nucleic Acids Res.* 23, 4055 (1995).

18. Petruska J., Arnheim N., Goodman M. F.: *Nucleic Acids Res.* **24**, 1992 (1996).
19. Smith G. C., Jie J., Fox G. E., Gao X.: *Nucleic Acids Res.* **23**, 4303 (1995).
20. Gacy A. M., Goelner G., Juranic N., Macura S., McMurray C. T.: *Cell* **81**, 533 (1995).
21. Chen X., Mariappan S. V. S., Catasti P., Ratliff R., Moyzis R. K., Laayoun A., Smith S. S., Bradburry E. M., Gupta G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5199 (1995).
22. Mariappan S. V. S., Catasti P., Chen X., Ratliff R., Moyzis R. K., Bradburry E. M., Gupta G.: *Nucleic Acids Res.* **24**, 784 (1996).
23. Mitas M., Yu A., Dill J., Haworth I. S.: *Biochemistry* **34**, 12803 (1995).
24. Fry M., Loeb L. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4950 (1994).
25. Usdin K., Woodford K. J.: *Nucleic Acids Res.* **23**, 4202 (1995).
26. Chen F.-M.: *J. Biol. Chem.* **270**, 23090 (1995).
27. Gao X., Huang X., Smith G. K., Zheng M., Liu H.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8883 (1995).
28. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R. J., Cheng X.: *Cell* **76**, 357 (1994).
29. Vodičková M., Zimulová M., Kovanda J., Kypr J.: nepublikované výsledky.
30. Darlow J. M., Leach D. R. F.: *Genetics* **141**, 825 (1995).
31. Kohwi Y., Wang H., Kohwi-Shigematsu T.: *Nucleic Acids Res.* **21**, 5651 (1993).
32. Mitchel J. E., Newbury S. F., McClellan J. A.: *Nucleic Acids Res.* **23**, 1876 (1995).
33. Chastain II P. D., Eichler E. E., Kang S., Nelson D. L., Levene S. D., Sinden R. R.: *Biochemistry* **34**, 16125 (1995).
34. Pearson Ch. E., Sinden R. R.: *Biochemistry* **35**, 5041 (1996).
35. Epplen J. T., Kyas A., Mäueler W.: *FEBS Lett.* **389**, 92 (1996). heteroduplexes of the
36. Wang Y.-H., Amirhaeri S., Kang S., Wells R. D., Griffith J. D.: *Science* **265**, 669 (1994).
37. Godde J. S., Wolffé A. P.: *J. Biol. Chem.* **271**, 15222 (1996).
38. Yano-Yanagisawa H., Li Y., Wang H., Kohwi Y.: *Nucleic Acids Res.* **23**, 2654 (1995).
39. Rosche W. A., Laworski A., Kang S., Kramer S. F., Larson J. E., Geidroc D. P., Wells R. D., Sinden R. S.: *J. Bacteriol.* **178**, 5042 (1996).
40. Vris S., Griffiths B. L., Harley V., Goodfellow P., Lovell-Badge R.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* **37**, 1137 (1995).
41. Zaho Y., Cheng W., Gibb C. L. D., Gupta G., Kallenbach N. R.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* **14**, 235 (1996).
42. Kang S., Jaworski A., Oshima K., Wells R. D.: *Nature Genetics* **10**, 213 (1995).
43. Kang S., Oshima K., Jaworski A., Wells R. D.: *J. Mol. Biol.* **258**, 543 (1996).
44. Kang S., Oshima K., Shimitzu M., Amirhaeri S., Weels R. D.: *J. Biol. Chem.* **270**, 27014 (1995).
45. Mytelka D. S., Chabmerlin M. J.: *Nucleic Acids Res.* **24**, 2774 (1996).
46. Oshima K., Kang S., Larson J. E., Weels R. D.: *J. Biol. Chem.* **271**, 16773 (1996).
47. Ji J., Clegg N. J., Peterson K. R., Jackson A. L., Laird Ch. D., Loeb L. A.: *Nucleic. Acids Res.* **24**, 2835 (1996).
48. Behn-Krappa A., Doerfler W.: *Human Mutation* **3**, 19 (1994).
49. Kunkel T. A., Wilson S. H.: *Nature* **384**, 25 (1996).

J. Kypr and M. Voričková (Biophysical Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno): Conformational Properties, and Expansion of DNA Molecules Containing Tandem Repeats of the Triads Starting with Cytosine and Ending with Guanine

The review concerns conformational properties, interactions with proteins, and expansion during replication of various DNA molecules containing simple sequence repeats (CAG)_n, (CTG)_n, (CCG)_n, and (CGG)_n. Attention is paid not only to the formed relatively stable intrastrand hairpins, but also to their associations into bimolecular complementary strands which appear to have unusually compact conformations difficult to overcome during replication. It is pointed out that some simple sequence-repeat oligonucleotides are expanded by DNA polymerases even in the absence of any natural DNA. The review indicates that DNA conformations of the simple sequence repeats should be taken into account in the studies of genome function, evolution, and pathogenesis.