

УДК 577.113:577.323.3:577.323.5

Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов

Р. В. Решетников^{1,4}, А. М. Копылов^{2,3,4}, А. В. Головин^{1,4*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40⁴ООО «Апто-Фарм», 115446, Москва, Коломенский пр., 13А

*E-mail: golovin@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 08.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Работа посвящена анализу структуры G-квадруплексных ДНК методами биоинформатики. Интерес к квадруплексным ДНК определяется их участием в функционировании теломер, онкопромоторов, возможностью создания на их основе аптамеров и наноконструкций. Разработан алгоритм общего анализа полиморфизма структуры квадруплексов из банка данных PDB с помощью оригинальных параметров. 74 структуры были сгруппированы по следующим параметрам: количество тяжей ДНК, количество квартетов, положение и ориентация соединяющих их петель. Для описания структуры квадруплекса использовали два количественных параметра: угол поворота между двумя соседними квартетами (как для комплементарной пары в двойной спирали ДНК) и планарность квартетов (оригинальный параметр). Паттерны распределения этих значений являются специфичными для каждой группы квадруплексных структур и зависят от типа петель, соединяющих квартеты: диагональные, латеральные, пропеллерные. Эталонном для сравнения выбран тетрамолекулярный квадруплекс, образованный четырьмя тяжями ДНК, который не содержал петель. Латеральные петли сильнее всего искажают структуру квадруплексов: углы поворота отличаются низкими значениями и не характерны для других типов квадруплексов. Петли диагонального типа деформируют квадруплексы значительно слабее; структуры с пропеллерными петлями характеризуются оптимальной геометрией G-квартетов. Таким образом, найдена корреляция между углом поворота и напряженностью структуры квадруплексной ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА G-квадруплекс, G-квартет, угол закручивания, петли, структура.

ВВЕДЕНИЕ

G-квадруплексы

Известно, что тяжи гуанозиновых олиго- и полинуклеотидов способны агрегировать друг с другом при условии, что моновалентный катион, такой, как калий или натрий, представлен в растворе. С помощью дифракционного анализа было показано, что такие поли(G)-нити представляют собой новый тип укладки ДНК, четырехцепочечную спираль [1–3], где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую G-G-парными взаимодействиями (рис. 1). Такие структуры отличаются высокой стабильностью и называются гуаниновыми (G)-квартетами, или G-тетрадами.

Каждый G-квартет скреплен в сумме восемью водородными связями, образованными взаимодействиями Уотсон-Криковской стороны одного гуанинового основания с Хугстиновской стороной другого.

Нуклеиновые кислоты, содержащие G-тетрадный мотив, представляют интерес не в последнюю очередь потому, что гуанин-богатые последовательности чрезвычайно широко представлены во всех открытых на данный момент геномах. Такие мотивы были обнаружены в промоторных регионах и сайтах переключения в составе последовательности иммуноглобулиновых генов, «горячих точках» рекомбинации и др. [4]. G-квартеты также представлены в ДНК на концах эукариотических хромосом, известных как теломеры [5]. Теломерная ДНК представляет из себя тандемные

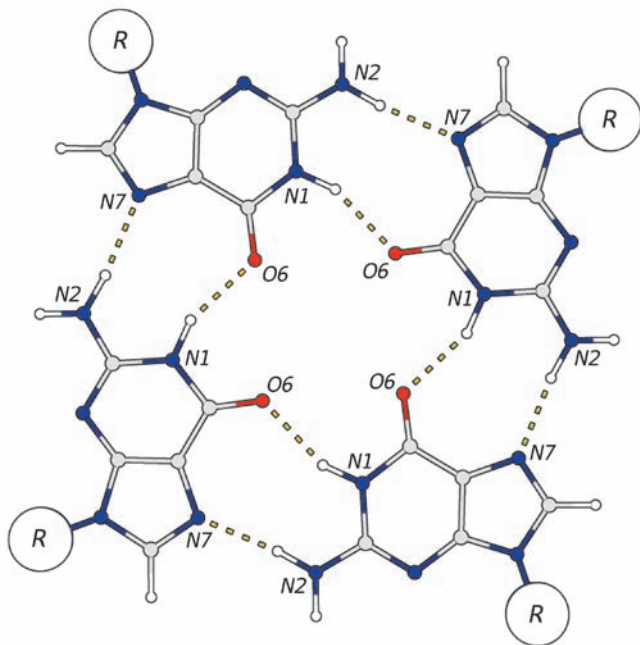


Рис. 1. Организация G-квартета. Четыре остатка гуанина образуют квадратную компланарную структуру, каждое гетероциклическое основание является донором и акцептором водородной связи: N1 и N2 с одной стороны гетероцикла, O6 и N7 с другой стороны гуанозина приводят к образованию 8 водородных связей на квартет. Сахарофосфатный остов оснований ДНК обозначен R.

повторы коротких поли-G-блоков, которые иногда включают в себя аденины или тимины: $G_n T_n$, $G_n T_n G_n$, $G_n A_n$ или $(TTAGGG)_n$; теломерные ДНК ассоциированы с теломерными белками. Тип повтора является видовзависимым: например, повтор $(TTAGGG)_n$ характерен для млекопитающих. Функция теломер заключается в защите хромосомных концов от нежелательных повреждений в результате рекомбинации или воздействия нуклеаз. Человеческая теломерная ДНК в соматических клетках в среднем составляет 8–10 т.п.о. Терминальные же 100–200 нуклеотидов с 3'-конца представляют собой однотяжевой «хвост» [6], конформационно ничем не ограниченный. В живых клетках этот «хвост» ассоциирован с белком POT1 [7], в отсутствие же этого белка однотяжевая теломерная ДНК способна складываться и димеризоваться, формируя четырехцепочечные шпильки, которые могут стабилизироваться формированием гуаниновых тетрад [8, 9]. Другой способ стабилизации такой ДНК – формирование внутримолекулярных G-квартетов путем многократного складывания. Такие G-квартетсодержащие структуры называются квадруплексами или тетраплексами [10]. Помимо теломер, G-квадруплексные последовательности были

локализованы в промоторах ряда онкогенных и ассоциированных с раком генов, таких, как *k-ras* [11], *c-kit* [12] и *bcl2* [13]. Таким образом, выглядит перспективной возможность ингибирования экспрессии соответствующих генов с помощью специфичных к квадруплексам агентов, таких, как порфирин TMPyP4 [14, 15].

G-квадруплексы могут быть также образованы короткими олигонуклеотидами с соответствующей последовательностью, которую можно записать как $G_m X_n G_m X_o G_m X_p G_m$, где m – количество гуанинов в G-блоке. Эти гуанины обычно непосредственно задействованы в образовании G-тетрад. X_n , X_o и X_p могут быть комбинацией любых остатков, включая G; такие участки формируют петли между G-тетрадами.

Некоторые из таких последовательностей обладают аптамерными свойствами при сворачивании в квадруплексные структуры. Аптамеры – это короткие синтетические олигонуклеотиды или пептиды, способные специфически узнавать любые мишени, от малых молекул до целых клеток, являясь аналогами моноклональных антител [16, 17]. Были идентифицированы G-квадруплексные аптамеры, мишенями которых является широкий спектр белков, таких, как тромбин [18] и STAT-3 [19]. Существуют G-квадруплексные аптамеры с антираковыми свойствами, для которых проводят клинические испытания. Механизм их действия связан с белком нуклеолином и его ролью в процессинге РНК [20].

Общие структурные черты квадруплексных ДНК

Формирование квадруплексной структуры из заданной квадруплексной последовательности может происходить различными путями, в зависимости от количества G-блоков. Четыре отдельных цепи могут ассоциироваться друг с другом с образованием межмолекулярного G-квадруплекса (рис. 2). Внутри-

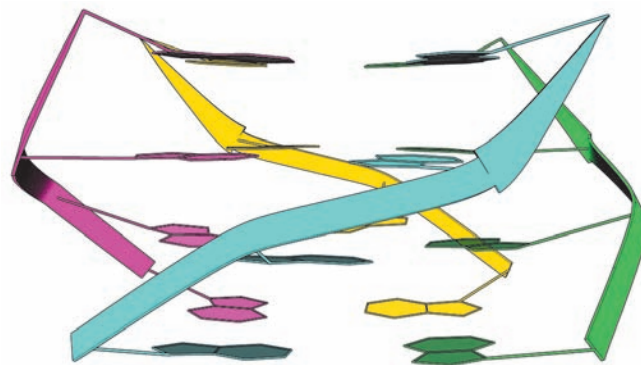


Рис. 2. Четырехтяжевой межмолекулярный параллельный G-квадруплекс.

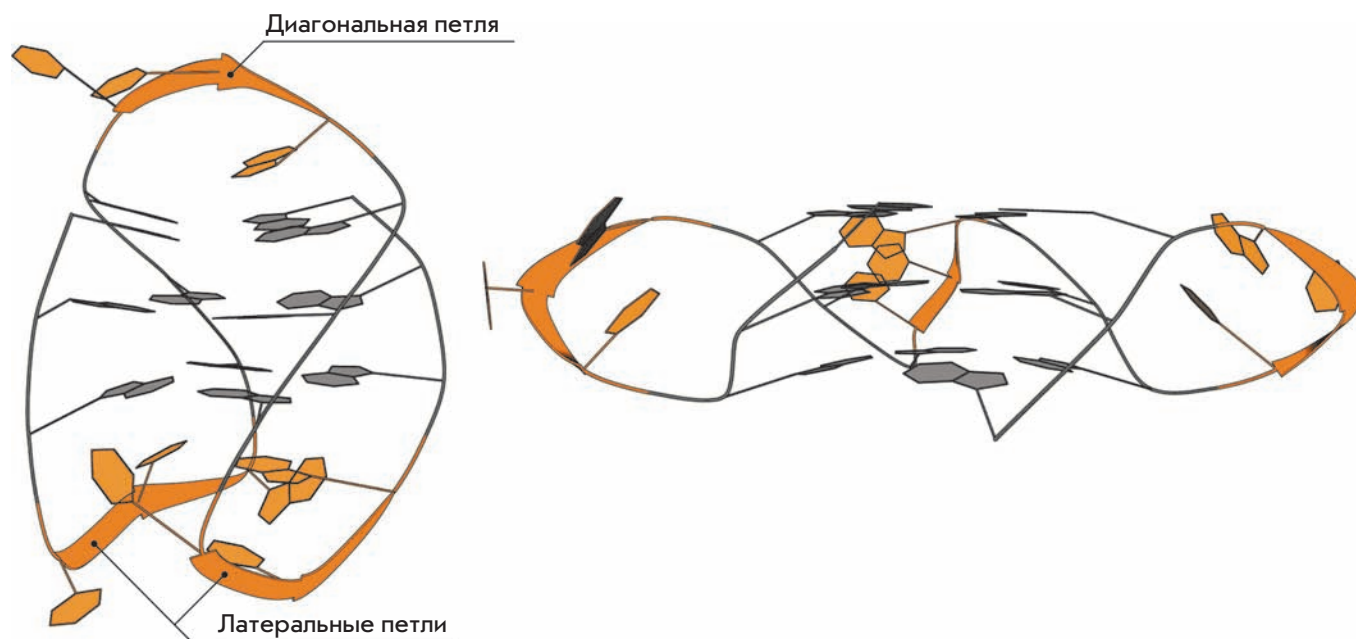


Рис. 3. Сворачивание цепи ДНК в одномолекулярный G-квадруплекс с тремя G-тетрадами. Два варианта укладки олигонуклеотида $d(AGGG(ТTAGGG)_3)$ различаются направленностью полинуклеотидной цепи в различных тяжах квадруплекса. Слева – топология с петлями латерального и диагонального типов [23], справа – топология с петлями пропеллерного типа, обрабатывающими ход цепи [24].

молекулярные тетраплексы образуются из одноцепочечной молекулы в результате сложной пространственной укладки нуклеотидной цепи (рис. 3).

Фундаментальный строительный элемент всех квадруплексных структур – G-квартет. Квартеты в структуре квадруплекса располагаются друг над другом, минимум два квартета необходимо для структурной стабильности тетраплекса [21]. Количество гуанинов в каждом отдельном G-блоке напрямую связано с количеством G-тетрад в окончательно свернутом квадруплексе. Например, в теломерных ДНК млекопитающих с тандемным повтором $d(ТTAGGG)$ квадруплексы, образованные четырьмя такими повторами, имеют три расположенных друг над другом G-квартета [22].

Квадруплекс стабилизируют те же самые факторы, что и дуплексную ДНК: стэкинг-взаимодействие оснований, водородные связи, электростатические взаимодействия и гидратная оболочка. Гидратация сахарофосфатного остова очень важна для стабильности структуры: в упорядоченной гидратной оболочке молекулы воды с помощью разветвленной сети водородных связей объединяют в единое целое основания, сахара и заряженные фосфаты, которые локализованы на внешней поверхности квадруплекса [25–27].

Кроме этих стандартных для дуплексной ДНК стабилизирующих факторов, у квадруплексов су-

ществует весьма специфическая важная составляющая – большой вклад в стабильность вносит координация O6 карбонил-катионами [28, 29]. Атомы O6 образуют квадрат в каждом квартете, что в квадруплексе дает библиридную антипризму с расстоянием 3.3 Å между квартетами [30]. Это отрицательно заряженное пространство между тетрадами должно быть стабилизировано путем координации катиона. На стабильность образованного квадруплекса существенно влияет природа катиона – размер/ионный радиус и заряд [29].

Четыре гуанозинового нуклеотида в составе тетрады могут существовать либо в *анти*-, либо в *син*-конформации относительно гликозидной связи, таким образом, существует 16 возможных комбинаций. Взаимная ориентация отдельных цепей в квадруплексе влияет на гликозидные углы. Например, при параллельной ориентации всех четырех цепей (рис. 2) все гликозидные углы находятся в *анти*-конформации. При антипараллельной ориентации в составе квадруплексов присутствуют как *син*-, так и *анти*-гуанины вне зависимости от того, образован квадруплекс четырьмя цепями или одной.

Различные нуклеотидные последовательности между G-блоками формируют внеспиральные петли. Эти петли бывают трех типов. В параллельном внутримолекулярном квадруплексе необходима петля, соединяющая нижнюю G-тетраду с верхней,

в результате чего получаются петли пропеллерного типа (рис. 3, справа). Антипараллельные квадруплексы – это такие, в которых хотя бы одна цепь антипараллельна другим. Такая топология тетрад обнаружена в большинстве определенных на текущий момент бимолекулярных и внутримолекулярных квадруплексных структур. Помимо пропеллерных петель, в этих структурах наблюдаются еще два типа петель. Латеральные (боковые) петли соединяют соседние G-тяжи. Две таких петли могут располагаться как с одного, так и с противоположных полюсов молекулы, что соответствует расположению «голова к голове» или «голова к хвосту» в бимолекулярных комплексах. Второй тип антипараллельных петель – диагональные петли, соединяющие opposite G-тяжи (рис. 3, слева).

Все квадруплексные структуры имеют четыре бороздки, в отличие от двойной спирали, имеющей только две. Бороздки образуются полостями, ограниченными сахарофосфатными остовами. Размеры бороздок очень сильно разнятся, в зависимости от общей топологии и природы петель, а также гликозидных углов. В квадруплексах с петлями исключительно диагонального или латерального типа бороздки структурно просты, в структурах с петлями пропеллерного типа они обладают более сложными структурными чертами.

Таким образом, существует большое число структурных переменных (количество G-тетрад, тип петель, последовательности и длина, направленность петель), которые приводят к большому топологическому и структурному разнообразию квадруплексов. В данной работе мы сделали попытку выявить взаимосвязь между структурой и свойствами G-квадруплексных ДНК и определить факторы, влияющие на геометрию квадруплексов.

МЕТОДЫ

Создание выборки квартетов

Список структур, содержащих квадруплексы, был составлен на основе списка базы данных PDB. Все найденные структуры были разделены на 8 групп согласно геометрии пространственной организации квадруплекса. На основе языка Perl и модулей Vector::Real и Statistics::Descriptive была разработана программа, которая определяет наличие квартетов в структуре, их расположение и измеряет геометрические параметры. Квартет определяется следующим образом: для гуанина должен существовать сосед, контактирующий атомом N7 с атомом O6 начального гуанина. Выбранная комбинация признается квартетом, если четвертый гуанин взаимодействует с первым и все гетероциклические осно-

вания находятся в одной плоскости с максимально допустимым удалением атомов от плоскости, составляющим 2 Å. Следующим квартетом квадруплекса признавался квартет, располагающийся ближе всего к исходному и для которого расстояние между атомами C1' до ближайших нуклеотидов было не более 10 Å (таким образом исключались варианты, когда тетраду составляли гуанины из разных квартетов). Структуры, принадлежащие разным ЯМР-моделям, обрабатывались как независимые квадруплексы.

Угол поворота квартетов относительно друг друга в квадруплексе

Для определения углов закрутки квадруплекса измерялся угол между двумя векторами. Первый вектор соединял атомы C1' двух соседних нуклеотидов в квартете, второй вектор соединял атомы C1' в соответствующих нуклеотидах в соседнем квартете (рис. 4).

Отклонения квартета от плоскости

Для измерения степени нарушения симметричности и планарности отдельного квартета предложен оригинальный параметр – расстояние между центрами масс двух четырехгранников. Первый четырехгранник образован четырьмя атомами N9 гуанинов квартета, а второй четырехгранник образован четырьмя атомами O6 тех же гуанинов (рис. 4). Если квартет

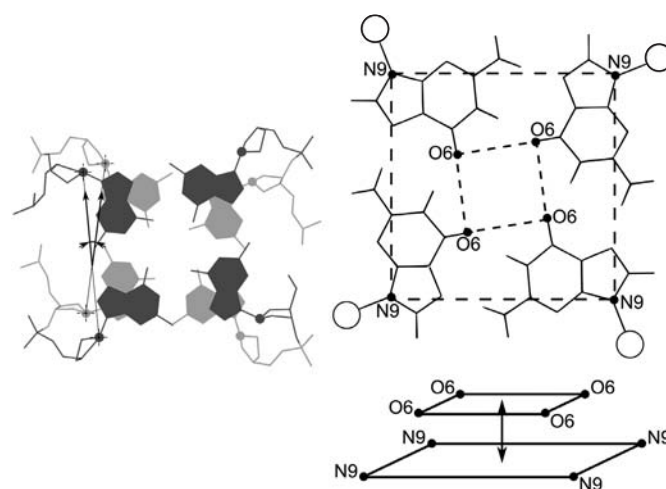


Рис. 4. Определение измеряемых параметров. Слева – определение углов закрутки квадруплекса. Кругами показаны атомы C1'. Справа – схема взаимного расположения двух четырехгранников: внешнего, образованного атомами N9, и внутреннего, образованного атомами O6. Если планарность квартета нарушается, то внутренний четырехгранник выходит из плоскости квартета. Расстояние между центрами масс внутреннего и внешнего квартетов служит численным параметром отклонения от плоскости.

симметричный и все гуанины образуют водородные связи друг с другом, то этим параметром фиксируется планарность квартета. В случае разрыва водородных связей симметрия квартета нарушается, и параметр фиксирует степень искажения квартета. Этот подход также фиксирует оба описанных выше случая одновременно.

Гистограмма распределения значений углов закрутки квадруплекса и отклонений квартета от плоскости

Для каждой из восьми полученных групп значения параметров объединялись, и строилась гистограмма распределения. Для углов закрутки выбран диапазон от 0 до 60°; отклонения от плоскости анализировались в диапазоне от 0 до 2 Å; диапазоны углов и расстояний разбивались на 15 интервалов. Данные анализировали с помощью программы Gnuplot (<http://www.gnuplot.info>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры описания геометрии и конформационного полиморфизма квадруплексов

Даже поверхностный анализ многообразия обнаруженных для квартетов вариантов структур, присутствующих в базе данных PDB, приводит к заключению о необходимости систематизации и выработки универсальных параметров описания структуры квартетов и их полиморфизма. До настоящего времени такие попытки в литературе не описаны.

В данной работе в качестве структурных характеристик квадруплексов было выбрано два параметра: угол закручивания квадруплекса, т.е. угол поворота между двумя соседними квартетами, описываемый углом между двумя векторами, проходящими через атомы C1' двух соседних гуанинов (рис. 4). Этот параметр широко используется для описания структур двойной спирали [31]. Ранее нами было показано, что угол закручивания квадруплекса является мерой напряженности структуры олигонуклеотида [32]. В качестве второго параметра выбран оригинальный параметр, который описывает отклонение квартетов от планарности – расстояние между центрами масс двух квадратов, образованных атомами O6 и N9 соответственно (рис. 4). Два этих параметра позволяют в достаточной мере описать конформационный полиморфизм и конформационную подвижность структуры квадруплексной ДНК.

Четырехтяжевые параллельные квадруплексы

Состав группы (ID PDB):

- 1EVM [33], 1EVN [33], 1NP9 [34], 1NZM [35], 1O0K [36] – теломерная ДНК (человек);

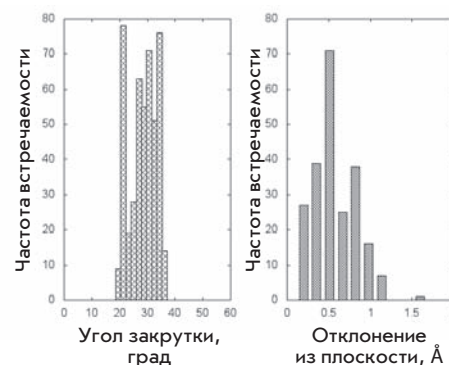


Рис. 5. Схема пространственной организации и геометрические характеристики первой группы структур.

- 139D [23, 37] – теломерная ДНК (*Tetrahymena*);
- 1EMQ [38] – теломерная ДНК (*Saccharomyces cerevisiae*);
- 1EVO [39] – фрагмент вирусного генома SV40.

Рассматриваемая группа представляет собой простейший вариант устройства квадруплексных структур. Угол закручивания в таких структурах можно рассматривать как идеальный, поскольку ассоциация четырех тяжей не накладывает никаких структурных ограничений, чего не наблюдается в случае бимолекулярных и мономолекулярных квадруплексов.

Четырехтяжевые параллельные квадруплексы характеризуются широким спектром углов закручивания (рис. 5), с двумя областями предпочтительных значений: узкой, соответствующей 21°, и более размытой, находящейся в пределах 27°–34°. Планарность квартетов таких структур также варьирует, в большинстве случаев квартеты имеют небольшое отклонение от плоскости, составляющее 0.5 Å, однако максимальные отклонения превышают 1 Å. Найденная полидисперсность параметров иллюстрирует разнообразие возможностей конформационного полиморфизма четырехтяжевых параллельных квадруплексов, в образование которых при межмолекулярной ассоциации не вносятся никаких структурных ограничений.

Структура типа «кресло»

Состав группы:

- 148D [40], 1C32 [41], 1C34 [41], 1C35 [41], 1C38 [41], 1QDF [42], 1QDH [42], 1RDE [43] – ДНК-аптамер к тромбину;
- 2KM3 [22] – теломерный повтор STAGGG (человек).

Структура типа «кресло» представляет собой мономолекулярный квадруплекс, соединенный тремя петлями латерального типа. Это в достаточной степени уникальная структура, представленная лишь двумя молекулами: 15-звенным ДНК-аптамером

к тромбину (148D, 1C32, 1C34, 1C35, 1C38, 1QDF, 1QDH, 1RDE) и 22-звенным олигонуклеотидом, образованным теломерным повтором STAGGG (2KM3). Такие структуры характеризуются значительно более низкими значениями углов поворота по сравнению с предыдущей группой межмолекулярных четырехтяжевых квадруплексов, у которых петли отсутствуют (рис. 6). Среднее значение углов закручивания квадруплексов для структур типа «кресло» составляет 15° с отклонением $\pm 5^\circ$. Квартеты таких структур характеризуются высокой планарностью, скачок значений в области $0.8\text{--}0.9 \text{ \AA}$ соответствует структурам, разрешенным в растворах с высокой ионной силой. Планарность объясняется тем, что гетероциклические основания латеральных петель образуют стэкинг-взаимодействия с основаниями квартетов и тем самым ограничивают их отклонения от плоскости.

Одномолекулярные квадруплексы с топологией цепи (3+1)

Состав группы:

- 2JSK [44], 2JSQ [44], 186D [45], 2GKU [46], 2HY9 [47], 2JPZ [48], 2JSL [44], 2JSM [44] – теломерная ДНК (человек, *Tetrahymena*);
- 2F8U [49] – промотор белка BCL2 (человек).

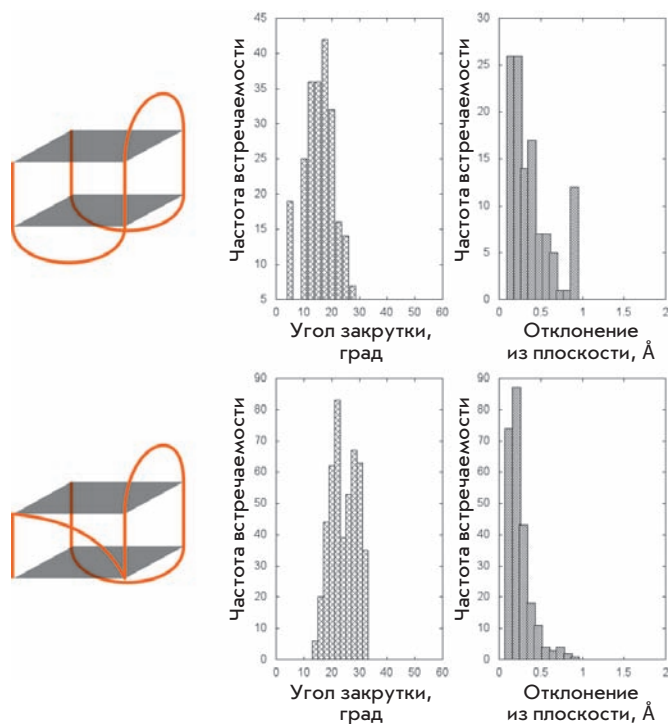


Рис. 6. Схема пространственной организации и геометрические характеристики второй и третьей групп структур.

Такие квадруплексы имеют в своем составе две петли латерального и одну пропеллерного типа, обрабатывающую ход полинуклеотидного тяжа в обратную сторону. От предыдущего типа квадруплексов данный класс отличается только наличием пропеллерной цепи и это существенно сказывается на значениях угла закручивания (рис. 6). У паттерна распределения углов появляется дополнительное распределение с максимумом $28^\circ \pm 4^\circ$. Более того, характерные для квадруплексов с латеральными петлями значения углов закручивания в диапазоне $10^\circ\text{--}20^\circ$ сдвинуты на $2^\circ\text{--}4^\circ$ в сторону больших значений. Квартеты квадруплексов данного типа очень планарны. Как и для квартетов в предыдущем случае, планарность фиксируется стэкинг-взаимодействиями с гетероциклическими основаниями латеральных петель.

Структура типа «корзина»

Состав группы:

- 2KF8 [50], 2KKA [51], 2KOW [52], 143D [23], 230D [53], 201D [54] – теломерная ДНК (человек, *Oxytricha*).

Структуры типа «корзина» представляют собой мономолекулярный квадруплекс, соединенный двумя петлями латерального и одной диагонального типа. Как и в предыдущем случае, замена латеральной петли на диагональную приводит к изменению характера распределения углов закручивания – появляется два ярко выраженных плеча со средними значениями $18^\circ \pm 4^\circ$ и $36^\circ \pm 4^\circ$ (рис. 7). Таким образом, появление диагональной петли определяет появление в конформационном ландшафте квадруплексов новый набор структур, характеризующихся углами закручивания квадруплекса большими, чем максимальные из встречающихся в четырехтяжевых параллельных квадруплексах, не имеющих петель. Степень планарности квартетных структур типа «корзина» меньше, чем у рассмотренных ранее структур с латеральными пет-

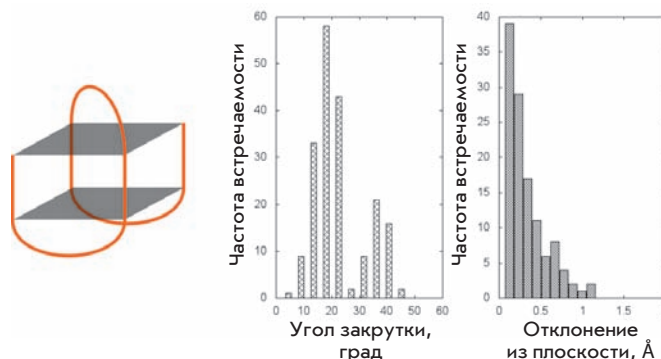


Рис. 7. Схема пространственной организации и геометрические характеристики четвертой группы структур.

лями, что, видимо, обусловлено уменьшением стэкинг-взаимодействий гетероциклических оснований диагональной петли с верхним квартетом.

Одномолекулярные параллельные квадруплексы с пропеллерными петлями

Состав группы:

- 1KF1 [24], 3CDM [55] – теломерная ДНК (человек);
- 1XAV [56], 2A5P [57], 1A5R [57] – промотор с-МҮС (человек);
- 2KQG [58], 2KQH [58], 2KYP [59] – промотор онкогена с-kit (человек);
- 1MYQ [60] – синтетический олигонуклеотид (GGA)₄;
- 1Y8D [61] – аптамер к интегразе ВИЧ-1.

Такие необычные структуры представляют собой внутримолекулярные квадруплексы, все петли которых представляют пропеллерный тип и полинуклеотидный тяж трижды меняет направление. Наличие пропеллерных петель жестко определяет структуру квадруплекса: распределение углов закручивания имеет выраженный максимум со значением $31^\circ \pm 3^\circ$ (рис. 8). Это значение близко к полученному для четырехтяжевых параллельных квадруплексов, у которых нет петель. Данный тип квадруплексов имеет планарные квартеты. Возможно, что пропеллерные петли обеспечивают оптимальную геометрию квадруплексов с жестко закрепленным сахарофосфатным остовом.

Бимолекулярные квадруплексы с латеральными петлями

Состав группы:

- 1A8N [62], 1A8W [63] – тандемный повтор GGGC;
- 1F3S [64] – синтетический олигонуклеотид.

В отличие от одномолекулярных квадруплексов, которые образуются путем внутримолекулярного фолдинга, бимолекулярные квадруплексы образуются при димеризации двух сложенных сами на себя полинуклеотидных тяжей, которые имеют блоки гуа-

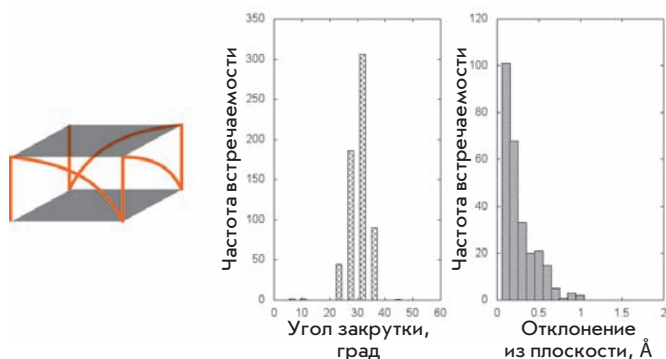


Рис. 8. Схема пространственной организации и геометрические характеристики пятой группы структур.

нинов. Представители данной группы квадруплексов отличаются сравнительно большой длиной латеральных петель (5–6 нуклеотидов). Их можно рассматривать как промежуточную группу между одномолекулярными квадруплексами с латеральными петлями и квадруплексами с диагональными петлями. Значения углов закручивания данных квадруплексов также показывают в пользу промежуточного положения этой группы – они находятся в области между двумя экстремумами, принадлежащими соседним группам (рис. 6, 7, 9). Можно отметить склонность рассматриваемых структур к закручиванию на $20^\circ \pm 1^\circ$ и 27° . Для более строгих заключений требуется большая статистическая значимость. Квартеты в квадруплексах данного типа очень планарны, по-видимому, из-за интенсивных стэкинг-взаимодействий с гетероциклическими основаниями петель.

Бимолекулярные квадруплексы с диагональными петлями

Состав группы:

- 156D [53, 65], 1JPQ [25], 1L1H [66], 1QDI [42], 1QDK [42], 3EM2 [67], 3EQW [67], 3ERU [67], 3ES0 [67], 3ET8 [67], 3EUM [67], 2AKG [68], 1K4X [53], 1JRN [25], 2HBN [69], 3EUI [67] – теломерная ДНК (*Oxytricha*);
- 2KAZ [70], 1U64 [71], 1LVS [72], 1FQP [73] – синтетические олигонуклеотиды.

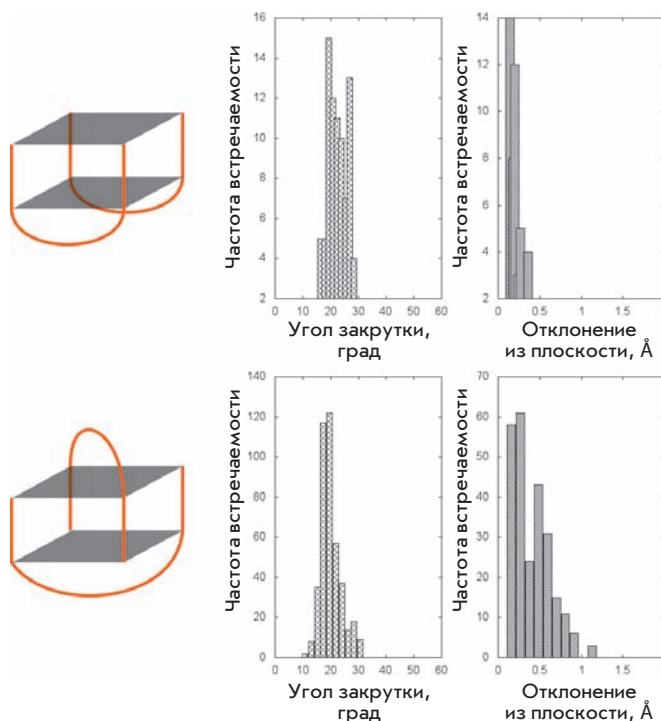


Рис. 9. Схема пространственной организации и геометрические характеристики шестой и седьмой групп структур.

Молекулы этой группы образуют бимолекулярные квадруплексы с диагональными петлями между противоположными углами квадруплекса. Таким образом, эти квадруплексы похожи на структуры типа «корзина», описанные ранее, у которых диагональная петля заменяет две латеральные петли. Для значений углов закручивания квадруплексов такая замена приводит к исчезновению плеча с максимумом 35° , оставляя только один максимум $19^\circ \pm 4^\circ$ (рис. 9). Распределение значений планарности квартетов также похоже на таковое у структур типа «корзина».

Бимолекулярные параллельные квадруплексы с пропеллерными петлями

Состав группы:

- 1K8P [24], 2HRI [74], 3SE5 [75] – теломерная ДНК (человек); 2KY0 [59] – промотор онкогена *c-kit* (человек);
- 1NYD [76], 1EEG [77], 1XSE [78] – синтетические олигонуклеотиды.

Для данного типа квадруплекса, как и для его мономолекулярного аналога, пропеллерные петли жестко ограничивают конформационный полиморфизм квадруплекса: распределение значений угла закручивания имеет максимум при $31^\circ \pm 3^\circ$; квартеты планарны (рис. 10).

Классификация квадруплексных структур

G-квадруплексные структуры локализованы на концах теломерных участков ДНК и промоторах ряда онкогенных и ассоциированных с раком генов. Это делает квадруплексы привлекательной мишенью для антираковой химиотерапии. Наиболее предпочтительной моделью взаимодействия антираковых агентов с квадруплексной ДНК являются стэкинг-взаимодействия с квартетами (терминальными либо за счет интеркаляции), с одной стороны, и взаимодействия с бороздками – с другой. Таким образом, детальное знание гео-

метрии этих элементов и причин, способных влиять на нее, является необходимым при рациональном поиске новых эффективных антираковых агентов.

Квадруплексы нуклеиновых кислот представляют интерес не только как мишени антионкогенных препаратов, но и как структурное ядро терапевтических агентов на основе аптамеров. В частности, это аптамеры к тромбину, к ВИЧ-1-интегразе, к опухолевому маркеру – белку нуклеолину, вовлеченному в процессинг РНК. Для оптимизации стабильности и эффективной самосборки этих олигонуклеотидов также необходимо знать природу сил, способных оказывать стабилизирующее и дестабилизирующее воздействие на молекулу аптамера.

Для квадруплексов характерно большое топологическое и структурное разнообразие, обусловленное такими переменными, как количество G-квартетов, направленность, тип, последовательность и длина петель. Для описания этого конформационного ансамбля мы выбрали два параметра – угол закручивания между двумя соседними квартетами и планарность квартетов.

Как показано в нашей работе, эти параметры успешно характеризуют самые сложные квадруплексные структуры. Надо отметить, что под параметром «планарность» мы подразумеваем обобщение двух явлений. В случае, если квартет симметричный и все гуанины образуют водородные связи друг с другом, этим параметром фиксируется именно планарность квартета. В случае разрыва водородных связей симметрия квартета нарушается, и параметр фиксирует степень искажения квартета.

Четырехтяжевой межмолекулярный параллельный квадруплекс является простейшим случаем, в котором имеет место лишь одна из указанных переменных – количество G-квартетов. Эта переменная определяет границы, в которых могут существовать такие структуры без ущерба для своей целостности. Границы довольно широки, в терминах угла закручивания они составляют 19° – 36° , с двумя областями предпочтительных значений: 21° и 27° – 34° . Движения терминальных квартетов таких структур ограничены лишь стэкинг-взаимодействиями с прилежащими квартетами и координационными связями со стабилизирующими катионами в случае их наличия. Таким образом, G-квартеты таких структур, особенно терминальные, не отличаются ярко выраженной планарностью.

Структуры типа «кресло» разительным образом отличаются от четырехтяжевых квадруплексов, в составе которых нет петель. Латеральные петли таких структур ограничивают геометрию квадруплексов, более того, они уводят ее в область значений углов закручивания, не свойственных беспетлевым квадруплексам. Если для последних минимальные углы

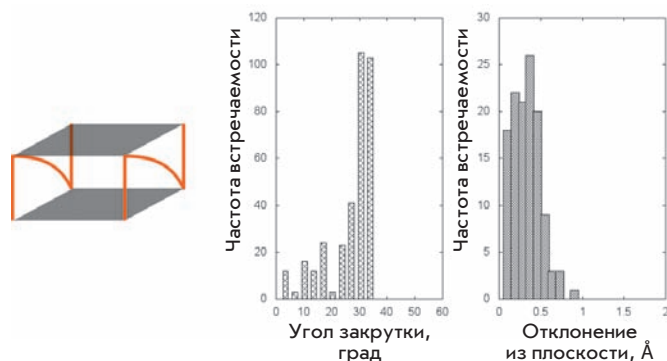


Рис. 10. Схема пространственной организации и геометрические характеристики восьмой группы структур.

составляют 19° , то для структур с петлями исключительно латерального типа область предпочтительных значений заключается в промежутке $15^\circ \pm 5^\circ$. Это говорит о том, что латеральные петли, в основном из-за небольшой длины, привносят в структуру квадруплекса существенные напряжения. В то же время из-за особенностей расположения, вытекающих из названия данного типа петель, на терминальных полюсах G-квадруплексов такие петли активно взаимодействуют с конечными квартетами квадруплексов за счет образования стэкинг-взаимодействий, что положительно сказывается на планарности квартетов структур типа «кресло».

Интересным является тот факт, что добавление петель диагонального или пропеллерного типа к структуре типа «кресло» существенно сказывается на паттерне распределения углов закручивания. Происходит сдвигание предпочтительной области значений углов в сторону больших величин, уже характерных для беспетлевых параллельных G-квадруплексов. В добавление к этому на паттерне появляется второе плечо, характеризующее область, примыкающую к петле отличного от латерального типа.

В структурах типа «корзина» хорошо видно, насколько велико напряжение, создаваемое латеральными петлями, располагающимися с одного полюса молекулы. Момент, создаваемый этими силами, разворачивает прилегающую к диагональной петле область молекулы в область углов закручивания, составляющих $36^\circ \pm 4^\circ$. Это выше допустимой нормы для беспетлевых параллельных квадруплексов, но диагональная петля за счет своей длины и эластичности компенсирует эту аномалию. Необходимо отметить, что такие значения углов закручивания не характерны для структур с петлями исключительно диагонального типа. В таких структурах геометрия квадруплексов довольно жестко ограничена значениями углов $19^\circ \pm 4^\circ$, что все же ближе к приемлемым для беспетлевых квадруплексов значениям. Таким образом, можно заключить, что напряжения, создаваемые латеральными петлями, сильнее создаваемых петлями диагонального типа. Интересно отметить, что часто используемый в описании квадруплексов паттерн *син/анти*-конформаций в группе бимолекулярных квадруплексов с диагональными петлями представлен наибольшим количеством ком-

бинаций. В то же время в этой группе наименьший разброс углов закручивания квадруплексов. Это наблюдение позволяет предположить, что доминирующим фактором влияния на структуру квадруплекса является тип петель.

Пропеллерные петли наиболее жестко определяют геометрию квадруплекса. Как в одномолекулярных, так и в бимолекулярных тетраплексах с петлями исключительно пропеллерного типа значения углов закручивания колеблются в пределах $31^\circ \pm 3^\circ$. Даже добавление к таким структурам латеральных петель слабо сказывается на закручивании прилежащих к пропеллерным петлям областей – оно характеризуется областью $28^\circ \pm 4^\circ$. Эти характеристики вписываются во вторую область предпочтительных значений для беспетлевых квадруплексов (27° – 34°). Видимо, такие углы закручивания соответствуют оптимальной геометрии G-квартета, поскольку тетрады структур с петлями пропеллерного типа отличаются высокой планарностью, в отличие от квадруплексов с диагональными петлями.

ВЫВОДЫ

В данной работе исследованы все известные на данный момент G-квадруплексные структуры. Эти структуры кластеризуются не только по топологии; многие группы представлены последовательностями с общим или родственным происхождением. Следует заметить, что в итоговое рассмотрение включены не все структуры – часть обладает слишком специфичной топологией, чтобы составить представительную выборку. Для описания геометрии квадруплексов мы предложили два параметра: угол закручивания тетраплекса и степень планарности G-тетрад. Мы показали, что основным источником напряжений в структуре квадруплексов являются петли, соединяющие блоки G-тяжей. Петли латерального типа наиболее сильно изменяют геометрию G-квадруплексов, однако их воздействие компенсируется добавлением в структуру петель диагонального и пропеллерного типа. Петли диагонального типа также достаточно жестко определяют структуру квадруплекса, однако создаваемые ими напряжения не столь велики, как в случае с латеральными петлями. Оптимальной же геометрией характеризуются квадруплексы с петлями пропеллерного типа. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gellert M., Lipsett M., Davies D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1962. V. 48. P. 2013–2018.
- Arnott S., Chandrasekaran R., Marttila C.M. // Biochem. J. 1974. V. 141. P. 537–543.
- Zimmerman S. // J. Mol. Biol. 1976. V. 106. P. 663–672.
- Simonsson T. // Biol. Chem. 2001. V. 382. P. 621–628.

- De Lange T. // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2005. V. 70. P. 197–204.
- Wright W.E., Tesmer V.M., Huffman K.E., Levene S.D., Shay J.W. // Genes Dev. 1997. V. 11. P. 2801–2809.
- Lei M., Podell E.R., Cech T.R. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 1223–1229.
- Sen D., Gilbert W. // Nature. 1988. V. 334. P. 364–366.

9. Sundquist W.I., Klug A. // *Nature*. 1989. V. 342. P. 825–829.
10. Gilbert D.E., Feigon J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. V. 9. P. 305–314.
11. Cogoi S., Xodo L.E. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 2536–2549.
12. Rankin S., Reszka A.P., Huppert J., Zloh M., Parkinson G.N., Todd A.K., Ladame S., Balasubramanian S., Neidle S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 10584–10589.
13. Dexheimer T.S., Sun D., Hurley L.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 5404–5415.
14. Siddiqui-Jain A., Grand C.L., Bearss D.J., Hurley L.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 11593–11598.
15. Hurley L.H., von Hoff D.D., Siddiqui-Jain A., Yang D. // *Semin. Oncol.* 2006. V. 33. P. 498–512.
16. Nimjee S.M., Rusconi C.P., Sullenger B.A. // *Annu. Rev. Med.* 2005. V. 56. P. 555–583.
17. Shamah S.M., Healy J.M., Cload S.T. // *Acc. Chem. Res.* 2008. V. 41. P. 130–138.
18. Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. // *Nature*. 1992. V. 355. P. 564–566.
19. Jing N., Zhu Q., Yuan P., Li Y., Mao L., Twardy D.J. // *Mol. Cancer Ther.* 2006. V. 5. P. 279–286.
20. McMicken H.W., Bates P.J., Chen Y. // *Cancer Gene Ther.* 2003. V. 10. P. 867–869.
21. Jayapal P., Mayer G., Heckel A., Wennmohs F. // *J. Struct. Biol.* 2009. V. 166. P. 241–250.
22. Lim K.W., Alberti P., Guédin A., Lacroix L., Riou J., Royle N.J., Mergny J., Phan A.T. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 6239–6248.
23. Wang Y., Patel D. // *Structure*. 1993. V. 1. P. 263–282.
24. Parkinson G.N., Lee M.P.H., Neidle S. // *Nature*. 2002. V. 417. P. 876–880.
25. Haider S., Parkinson G.N., Neidle S. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 320. P. 189–200.
26. Horvath M.P., Schultz S.C. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 310. P. 367–377.
27. Phillips K., Dauter Z., Murchie A., Lilley D., Luisi B. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. P. 171–182.
28. Hud N.V., Smith F.W., Anet F.A., Feigon J. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 15383–15390.
29. Kankia B.I., Marky L.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 10799–10804.
30. Deng J., Xiong Y., Sundaralingam M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 8. P. 13665–13670.
31. el Hassan M.A., Calladine C.R. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 251. P. 648–664.
32. Reshetnikov R., Golovin A., Spiridonova V., Kopylov A., Šponer J. // *J. Chem. Theory Comput.* 2010. V. 6. P. 3003–3014.
33. Patel P.K., Koti A.S., Hosur R.V. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 3836–3843.
34. Gavathiotis E., Searle M.S. // *Org. Biomol. Chem.* 2003. V. 1. P. 1650–1656.
35. Gavathiotis E., Heald R.A., Stevens M.F.G., Searle M.S. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 334. P. 25–36.
36. Clark G.R., Pytel P.D., Squire C.J., Neidle S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 4066–4067.
37. Wang Y., Patel D. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 8112–8119.
38. Patel P.K., Hosur R.V. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 2457–2464.
39. Patel P.K., Bhavesh N.S., Hosur R.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 270. P. 967–971.
40. Schultze P., Macaya R.F., Feigon J. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 235. P. 1532–1547.
41. Marathias V.M., Bolton P.H. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 1969–1977.
42. Marathias V.M., Wang K.Y., Kumar S., Pham T.Q., Swaminathan S., Bolton P.H. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 260. P. 378–394.
43. Mao X., Marky L.A., Gmeiner W.H. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2004. V. 22. P. 25–33.
44. Phan A.T., Kuryavyy V., Luu K.N., Patel D.J. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 6517–6525.
45. Wang Y., Patel D.J. // *Structure*. 1994. V. 2. P. 1141–1156.
46. Luu K.N., Phan A.T., Kuryavyy V., Lacroix L., Patel D.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 9963–9970.
47. Dai J., Punchedihewa C., Ambrus A., Chen D., Jones R.A., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 2440–2450.
48. Dai J., Carver M., Punchedihewa C., Jones R.A., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 4927–4940.
49. Dai J., Chen D., Jones R.A., Hurley L.H., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 5133–5144.
50. Lim K.W., Amrane S., Bouaziz S., Xu W., Mu Y., Patel D.J., Luu K.N., Phan A.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 4301–4309.
51. Zhang Z., Dai J., Veliath E., Jones R.A., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. P. 1009–1021.
52. Hu L., Lim K.W., Bouaziz S., Phan A.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 16824–16831.
53. Smith F., Feigon J. // *Nature*. 1992. V. 356. P. 164–168.
54. Wang Y., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 251. P. 76–94.
55. Parkinson G.N., Cuenca F., Neidle S. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 381. P. 1145–1156.
56. Ambrus A., Chen D., Dai J., Jones R.A., Yang D. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 2048–2058.
57. Phan A.T., Kuryavyy V., Gaw H.Y., Patel D.J. // *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 167–173.
58. Hsu S.D., Varnai P., Bugaut A., Reszka A.P., Neidle S., Balasubramanian S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 13399–13409.
59. Kuryavyy V., Phan A.T., Patel D.J. // *Nucl. Acids Res.* 2010. doi: 10.1093/nar/gkq558.
60. Matsugami A., Ouhashi K., Kanagawa M., Liu H., Kanagawa S., Uesugi S., Katahira M. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 255–269.
61. Phan A.T., Kuryavyy V., Ma J., Faure A., Andréola M., Patel D.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 634–639.
62. Kettani A., Bouaziz S., Gorin A., Zhao H., Jones R.A., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 282. P. 619–636.
63. Bouaziz S., Kettani A., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 282. P. 637–652.
64. Kettani A., Basu G., Gorin A., Majumdar A., Skripkin E., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 301. P. 129–146.
65. Smith F., Feigon J. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 8682–8692.
66. Haider S.M., Parkinson G.N., Neidle S. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 117–125.
67. Campbell N.H., Patel M., Tofa A.B., Ghosh R., Parkinson G.N., Neidle S. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 1675–1680.
68. Gill M.L., Strobel S.A., Loria J.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 16723–16732.
69. Gill M.L., Strobel S.A., Loria J.P. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 4506–4514.
70. Balkwill G.D., Garner T.P., Williams H.E.L., Searle M.S. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 385. P. 1600–1615.
71. Sket P., Crnugelj M., Plavec J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2004. V. 12. P. 5735–5744.
72. Crnugelj M., Hud N.V., Plavec J. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 320. P. 911–924.
73. Keniry M.A., Strahan G.D., Owen E.A., Shafer R.H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 233. P. 631–643.
74. Parkinson G.N., Ghosh R., Neidle S. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 2390–2397.
75. Campbell N.H., Parkinson G.N., Reszka A.P., Neidle S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 6722–6724.
76. Webba da Silva M. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 14356–14365.
77. Kettani A., Gorin A., Majumdar A., Hermann T., Skripkin E., Zhao H., Jones R., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 297. P. 627–644.
78. Webba da Silva M. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 3754–3764.