

УДК 517.323:615.277.3:577.151.042:577.218

ПАРАЛЛЕЛЬНЫЕ G-КВАДРУПЛЕКСЫ, ОБРАЗОВАННЫЕ ГУАНИН-БОГАТЫМИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМИ ПОВТОРАМИ, ИНГИБИРУЮТ ЧЕЛОВЕЧЕСКУЮ ТОПОИЗОМЕРАЗУ I*

© 2015 А.М. Оглоблина¹, В.А. Банникова², А.Н. Христинич²,
Т.С. Орецкая², М.Г. Якубовская¹, Н.Г. Долинная^{2**}

¹ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Институт канцерогенеза, 115478 Москва; факс: +7(495)324-1205,
электронная почта: globbi@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-3181,
электронная почта: dolinnaya@hotmail.com

Поступила в редакцию 15.12.14
После доработки 16.02.15

В работе методами УФ-спектроскопии и КД определена термодинамическая стабильность и структура G-квадруплексов (G_4), образуемых G-богатыми фрагментами микросателлитов человека, которые отличаются числом остатков гуанозина в повторяющейся единице. Показано, что олигонуклеотиды $d(GGGT)_4$ и $d(GGT)_4$ образуют внутримолекулярные параллельные G_4 , причем температура плавления G-квадруплекса резко уменьшается (более чем на 45°) при переходе от трех- к битетрадным структурам. Повторы $d(GT)_n$ не образуют совершенных G_4 (одна G-тетрада); элементы такой G-квадруплексной структуры не устойчивы при комнатной температуре и не стабилизируются ионами одновалентных металлов. Для олигонуклеотида $d(GGT)_4$ определена минимальная концентрация ионов K^+ , способствующая сборке квадруплекса, которая, как оказалось, зависит от поддерживающей концентрации ионов Na^+ . Впервые показано, что при параллельной ориентации цепей в четырехцепочечной структуре фланкирующие G_4 -мотив комплементарные участки (в олигонуклеотиде $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$) не могут образовать двойную спираль из-за стерической удаленности, а только дестабилизируют G-квадруплекс. Изучено влияние охарактеризованных олигонуклеотидов на активность топоизомеразы I, одного из основных клеточных ферментов, и прослежена взаимосвязь между стабильностью образуемых ими квадруплексов и степенью ингибирования фермента. Наиболее активным ингибитором с IC_{50} равной 0,08 мкМ оказался олигонуклеотид $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$, в котором фланкирующие G_4 -мотив последовательности уменьшали устойчивость сверхпрочной квадруплексной структуры, образованной $d(GGGT)_4$.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: G-квадруплексы, микросателлитные повторы, стабильность и структура G-квадруплексов, ингибиторы топоизомеразы I.

Микросателлитные повторы ДНК с размером повторяющейся единицы от 2 до 6 нуклеотидов широко распространены в геноме эукариот. Эти некодирующие последовательности ДНК долгое время считали балластными, и лишь в последние два десятилетия появились данные об их особой роли в метаболизме ДНК и функционировании генома. Установлено, что микросателлитные повторы являются горячими точками гомологичной рекомбинации и участками

повышенной геномной нестабильности [1]. Эти процессы играют важную роль в многостадийном канцерогенезе и других патологических состояниях [2]. Одной из причин необычных свойств микросателлитных ДНК может служить образование ими неканонических конформаций. Унифицированная повторяющаяся последовательность, отличная от случайной, способна генерировать новый структурный мотив из-за синхронизованных локальных изменений вторичной структуры ДНК, определяемой особой геометрией стэкинг-контактов. Действительно, все известные неканонические формы нуклеиновых кислот образуются последовательностями, которые обладают элементами сим-

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-341, 05.04.2015.

** Адресат для корреспонденции.

метрии, повторами и другими отклонениями от случайного распределения нуклеотидных остатков. Объектами нашего исследования служили несколько гуанин-содержащих последовательностей – $d(GGGT)_4$, $d(GGT)_4$ и $d(GT)_n$, которые имитируют одну из цепей микросателлитных повторов и имеют потенциал образования G-квадруплексов, одной из наиболее удивительных и активно изучаемых альтернативных форм ДНК [3–5]. G-квадруплексы (G_4) образуются путем внутри- или межмолекулярных взаимодействий молекул ДНК или РНК, содержащих тракты олигоG (G-тракты). Кор квадруплекса состоит из двух и более G-тетрад, в которых четыре остатка гуанина из разных трактов соединены системой хугстиновских водородных связей (рис. 1). Стэкинг-взаимодействия плоских G-тетрад формируют специфическую структуру G_4 . Квадруплексы ДНК и РНК – единственные неканонические структуры, образование которых в живой клетке строго доказано [6–8]. Являясь структурными элементами генома, G-квадруплексы распознаются многими белками и ферментами и влияют на важнейшие биологические процессы, такие как репликация, защита хромосомных концов, транскрипция, трансляция, мутагенез и

рекомбинация ДНК [9–13]. Кроме того, G_4 рассматриваются как мишени низкомолекулярных лигандов (потенциальных противоопухолевых средств), влияющих на уровень генной экспрессии [14, 15], а введенные в клетку олигонуклеотидные квадруплексы (ДНК-аптамеры) сами являются потенциальными лекарственными препаратами [16, 17].

Вероятность образования G-квадруплекса путем перестройки соответствующего участка двуспиральной геномной ДНК (G_4 -мотива) увеличивается в условиях отрицательной сверхспирализации [18]. Одним из основных ферментов, регулирующих топологическое состояние ДНК, является топоизомераза I. С одной стороны, этот фермент способен вызывать релаксацию ДНК, уменьшая количество сверхвитков, а с другой стороны, он может, как было недавно установлено, распознавать некоторые G-квадруплексы и связываться с ними, теряя свою ферментативную активность [19]. В частности, показано, что тромбин-связывающий ДНК-аптамер и олигонуклеотиды схожей первичной структуры способны ингибировать активность топоизомеразы I [20]. Ингибиторы топоизомеразы I представляют собой один из классов современ-

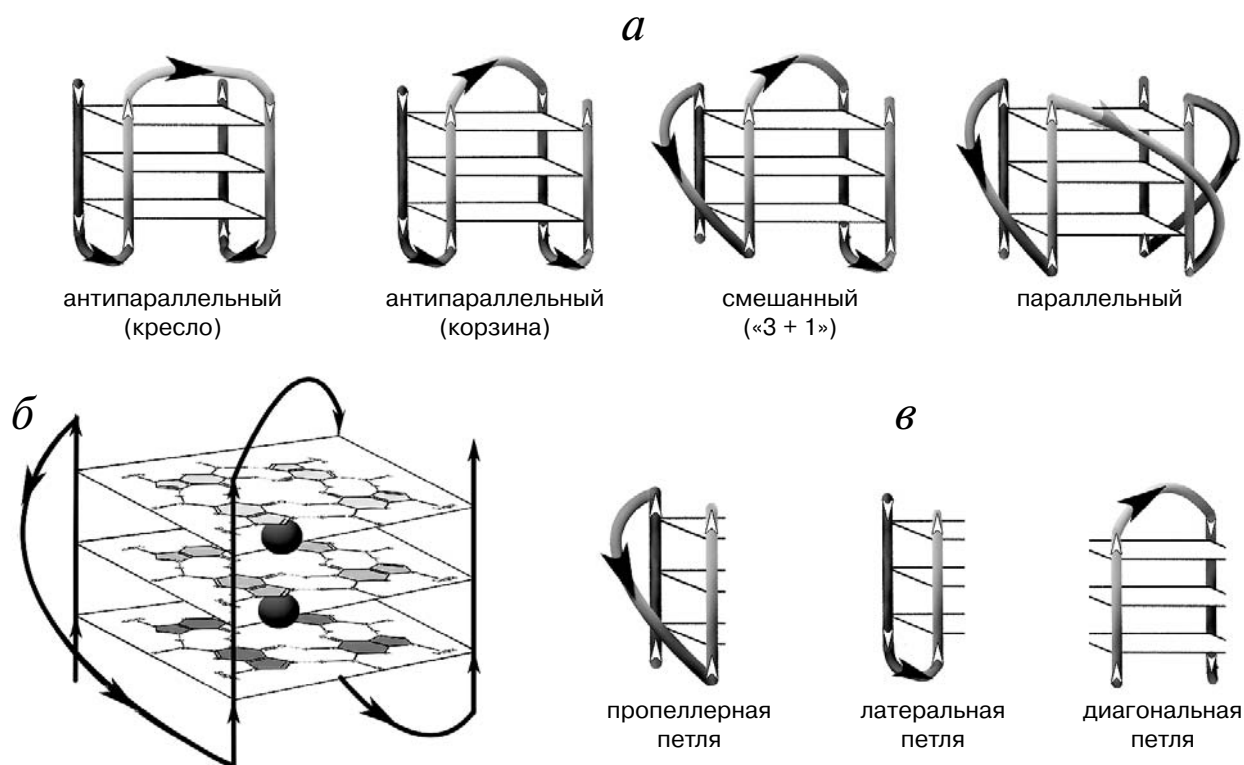


Рис. 1. Схематическое изображение различных по структуре G-квадруплексов. а – Внутримолекулярные G_4 , различающиеся ориентацией цепей в квадруплексном коре; б – параллельный G_4 , в котором приведена структура G-тетрад и участки связывания ионов калия (черные кружки); в – типы петель в квадруплексе, которые соединяют G-тракты

ных противоопухолевых препаратов, успешно применяемых при лечении гемобластозов, мелкоклеточном раке легких и ряде других онкологических заболеваний [21].

G-квадруплексы характеризуются огромным структурным многообразием, что обусловлено такими переменными, как количество формирующих квадруплексы молекул (1, 2 или 4), длина G-трактов, взаимная ориентация цепей [22], нуклеотидная последовательность (состав) и длина петель, соединяющих G-тракты [23–25] (рис. 1). Это осложняет понимание закономерностей функционирования G-квадруплексов в геноме и делает необходимым детальное изучение вторичных структур, образуемых конкретными G₄-мотивами.

В настоящей работе определена структура и стабильность (в разных экспериментальных условиях) квадруплексных структур, образуемых олигонуклеотидными моделями микросателлитов с тетра-, три- и динуклеотидными повторами – d(GGGT)₄, d(GGT)₄ и d(GT)_n, которые отличаются числом остатков гуанозина в G-тракте и количеством повторяющихся единиц, а также изучено влияние охарактеризованных олигонуклеотидов на активность топоизомеразы I, одного из основных ферментов метаболизма ДНК. Так как в геноме микросателлитные повторы фланкированы нерегулярными последовательностями, в качестве модельных систем мы использовали также олигонуклеотиды, содержащие в себе два мотива – анализируемую повторяющуюся последовательность и фланкирующие ее дуплекс-образующие фрагменты. Для изучения конформационного потенциала исследуемых олигонуклеотидов, оценки термодинамической стабильности образуемых ими вторичных структур и их характеристики использованы методы УФ-спектроскопии и КД. Способность охарактеризованных олигонуклеотидов ингибировать переход плазмидной ДНК в релаксированную форму под действием топоизомеразы I изучена с помощью электрофоретических методов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Олигонуклеотиды. В работе использовали очищенные в ПААГ олигодезоксирибонуклеотиды фирмы «Синтол» (Россия): d(GGGT)₄ (1), d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-TA-CCAGTG) (2), d(GGT)₄ (3), d(GT)₁₅ (4), d(GT)₁₆ (5), d(GT)₃₁ (6), d(CACTGG-T-(GT)₁₁-T-CCAGTG) (7), d(GCACTGG-T-(GT)₁₂-T-CCAGTGC) (8), d(GCACTGG-T-(GT)₁₃-T-CCAGTGC) (9), d(GCACTGG-T-(GT)₁₄-T-CCAGTGC) (10), d(CACTGG-T-

(GT)₁₅-T-CCAGTG) (11), d(GCACTGG-T-(GT)₁₅-T-CCAGTGC) (12), d(GCACTGG-T-(GT)₁₆-T-CCAGTGC) (13), d(GCACTGG-CC-(GT)₁₆-TA-CCAGTGC) (14), d(TAGTCTGGTACTGCAT-GCTATGCACG) (15). Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции, рассчитанные по методу ближайших соседей. Олигонуклеотиды растворяли в буферном растворе А (20 мМ HEPES-KOH, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, pH 7,3). Полученные растворы помещали в водяную баню, нагретую до температуры 95° и медленно (в течение нескольких часов) охлаждали до комнатной температуры (отжиг).

Для изучения влияния ионов одновалентных металлов на устойчивость вторичной структуры, образованной олигонуклеотидом d(GGT)₄, были приготовлены три серии растворов. Пробу 1 первой серии готовили, растворяя d(GGT)₄ в буфере Б (10 мМ Tris-HCl, pH 7,2) до конечной концентрации олигонуклеотида $9,4 \times 10^{-6}$ М в растворе объемом 400 мкл. Эта проба служила контролем, не содержащем ионы калия. Для приготовления других растворов этой серии к пробе 1 добавляли KCl в виде концентрированного раствора или навески в количестве, необходимом для достижения концентрации соли в диапазоне 5–750 мкМ. Вторую серию растворов готовили аналогичным образом в буфере В (10 мМ Tris-HCl, pH 7,2, 20 мМ NaCl). Диапазон концентраций KCl, добавленного к пробам, составлял 4–546 мМ. Для приготовления третьей серии растворов d(GGT)₄ в буфере Г (20 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, pH 7,3) к пробам добавляли KCl для достижения нужной концентрации в диапазоне 14–307 мМ. В пробах двух последних серий концентрация NaCl была постоянной (20 и 120 мМ для второй и третьей серий соответственно), а концентрация KCl варьировала. Пробы подвергали отжигу как описано выше.

УФ-спектроскопия. Кривые плавления олигонуклеотидных образцов регистрировали в термостатируемых кварцевых кюветках («Hellma», Германия) с длиной оптического пути 10 или 1 мм на двулучевом спектрофотометре Hitachi U-2900 («Hitachi», Япония), снабженным термоконтроллером SPR-10. Конформационные переходы регистрировали между 10 и 90° при 295 или 260 нм; скорость нагревания составляла 0,5° в мин. Концентрация олигонуклеотидов варьировала в диапазоне 5,3–70 мкМ.

Круговой дихроизм. Спектры КД регистрировали на спектрометре Chirascan («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания), снабженном термoeлектрическим контроллером в 10-миллиметровой кварцевой кювете («Hellma», Германия) между 7 и 85°; температура увеличивалась рав-

номерно со скоростью 0,5°/мин. Измерения проводили через каждые 3–8° в диапазоне длин волн 230–360 нм. Скорость сканирования составляла 1 нм/с. Кюветную камеру продували током азота для того, чтобы избежать конденсации воды на поверхности кюветы. Спектр буфера А, не содержащего олигонуклеотид, рассматривали как базовую линию, которую вычитали из спектра образца. Значения КД выражали в виде молярного дихроизма, $\Delta\epsilon$ ($\text{см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$), в расчете на олигонуклеотид. Спектры обрабатывали в программе Origin 8.0 с использованием фильтра Savitzky-Golay.

Изучение влияния гуанин-богатых олигонуклеотидов на активность топоизомеразы I. В работе использовали ядерный экстракт клеток HeLa, содержащий топоизомеразу I. Для его выделения клетки дважды промывали PBS-буфером и добавляли к ним 3 мл буфера Д (10 мМ HEPES, pH 7,6, 60 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT) и 0,1%-ный NP40, затем центрифугировали смесь при 200 g в течение 5 мин при 4°. К осадку (клеточным ядрам) добавляли 100 мкл буфера Д и повторно центрифугировали в тех же условиях. К осадку добавляли двукратный объем буфера Е (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 420 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ЭДТА, 25%-ный глицерин) и 1/6,25 часть 2,5 М раствора NaCl; смесь тщательно перемешивали и оставляли во льду на 10 мин. Далее смесь центрифугировали при 16 000 g в течение 10 мин при 4°. Супернатант (ядерный экстракт) хранили при –20°. За единицу активности топоизомеразы I принимали такую концентрацию ядерного экстракта, под действием которого за 30 мин при 37° 250 нг сверхспирализованной плазмиды pUC19 переходили в релаксированное состояние [26]. За релаксацией плазмиды следили с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Выделение pUC19 из клеток *E. coli* (штамм XL1-Blue) проводили с помощью набора «GeneJET plasmid miniprep kit» («Fermentas», США) согласно инструкциям производителя. Клетки наращивали в LB-среде, содержащей ампициллин в концентрации 0,1 мг/мл, при температуре 37° и постоянном перемешивании (300 об/мин) в течение 10 ч.

Для определения способности олигонуклеотидов влиять на активность топоизомеразы I к 0,15 мкг сверхспирализованной плазмидной ДНК pUC19 в буфере Ж (10 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 1 мМ ЭДТА, 0,15 М NaCl, 0,1%-ный BSA, 0,1 мМ спермидин, 5%-ный глицерин) добавляли 1 ед ядерного экстракта клеток HeLa и анализируемые олигонуклеотиды в разных концентрациях. Реакцию проводили в течение 30 мин при 37°, останавливали ее путем добавления додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1%

и обработки протеиназой К (50 мкг/мл) в течение 30–60 мин при 55°. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряжении электрического поля 2 В/см в стандартном Tris-боратном буфере при комнатной температуре, затем окрашивали их водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Количество ДНК в соответствующих полосах на геле оценивали, измеряя флуоресценцию в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм. Степень ингибирования фермента рассчитывали по формуле:

$$(S - S_0)/(S_{\text{control}} - S_0) \times 100\%, \quad (1)$$

где S – количество сверхспирализованной плазмиды после обработки топоизомеразой I в присутствии олигонуклеотида, S_{control} – количество сверхспирализованной плазмиды без обработки ферментом, S_0 – количество сверхспирализованной плазмиды после обработки топоизомеразой I в отсутствие олигонуклеотидного ингибитора.

Селективный ингибитор топоизомеразы I, камптотecin, был использован в качестве положительного контроля; его конечная концентрация в реакционной смеси составляла от 0,1 до 10 мкМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ G-квадруплексных структур, образованных олигонуклеотидом d(GGGT)₄ и его производным, в котором G₄-мотив фланкирован взаимно комплементарными последовательностями. Для характеристики вторичных структур, образуемых набором олигонуклеотидных моделей, была использована комбинация метода УФ-спектроскопии, позволяющего независимо проследить за процессами денатурации G-квадруплекса и ДНК-дуплекса, и метода КД, дающего возможность определить топологию квадруплексных структур [27, 28]. Характер температурной зависимости УФ-поглощения образца при 295–297 нм является маркером G-квадруплексной структуры. В отличие от ДНК-дуплекса, плавление которого (обычно при 260 нм) сопровождается гиперхромным эффектом, при разрушении G-квадруплекса происходит уменьшение оптической плотности раствора, причем этот процесс носит кооперативный характер. Кроме того, при этой длине волны денатурация ДНК-дуплекса, который может сосуществовать с G₄-структурой, не вносит вклад в профиль плавления G-квадруплекса [29].

Кривая УФ-плавления (при 295 нм) олигонуклеотида d(GGGT)₄ в буфере А, содержащем

ионы K^+ и Na^+ , отражает кооперативный переход спираль-клубок, соответствующий разрушению G-квадруплексной структуры (рис. 2, а). Гипохромный эффект превышает 10%; при этом термодинамическая стабильность структуры настолько высока ($T_{пл}$ более 85°), что записать полный профиль ее денатурации не удается. Профиль кривой плавления при 295 нм d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG), в котором шестинуклеотидные взаимно комплементарные фрагменты были присоединены через короткие линкеры к 5'- и 3'-концам (GGGT)-повтора, свидетельствует о том, что этот олигонуклеотид также образует G₄, однако его $T_{пл}$ (73°) более чем на 12° ниже температуры плавления его «нефланкированного» аналога d(GGGT)₄ (рис. 2, а). К тому же, величина гипохромного эффекта, сопровождающего разрушение квадруплексной структуры в этом случае составляет только 7%, т.е. существенно ниже величины, определенной для олигонуклеотида d(GGGT)₄. Этот эффект объясняется наличием в d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG) 16-ти нуклеотидных остатков (из 32-х), которые не вносят свой вклад в плавление G₄, но поглощают УФ-свет. Дестабилизирующее влияние олигонуклеотидных фрагментов, фланкирующих (GGGT)-повтор, может быть связано с тем, что эти последовательности не гибридизуются при формировании G-квадруплекса, что является энергетически невыгодным. Действительно, плавление d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG) при 260 нм сопровождается незначи-

тельным некооперативным увеличением оптической плотности, что свидетельствует об отсутствии дуплексной структуры (рис. 2, б).

Топология квадруплекса, образованного олигонуклеотидами d(GGGT)₄ и d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG), была определена методом КД. Как известно, на спектры КД квадруплексной ДНК влияет ориентация гуанинового основания относительно углеводного цикла (поворотные изомеры *син*-*анти* вокруг N-гликозидной связи). Поэтому G₄ антипараллельной и смешанной (параллельной-антипараллельной) топологии, в которой гуанозины имеют как *син*-, так и *анти*-конформацию, можно отличить от квадруплексов параллельной топологии, в которых все остатки гуанозина имеют *анти*-конформацию. В то время как спектры КД антипараллельного G₄ имеют характеристический положительный максимум при 295 нм наряду с отрицательным пиком при 265 нм и положительным пиком около 245 нм, параллельный G₄ имеет положительный максимум при 260 нм. Вид спектров КД d(GGGT)₄ и d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG) свидетельствует о параллельном расположении тяжей в коре квадруплекса с пропеллерными петлями (рис. 2, в).

Предполагаемая нами вторичная структура, образуемая при внутримолекулярном складывании d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG), представлена на рис. 3, а. Видно, что при параллельной ориентации цепей в структуре G-квадруплекса комплементарные последовательности

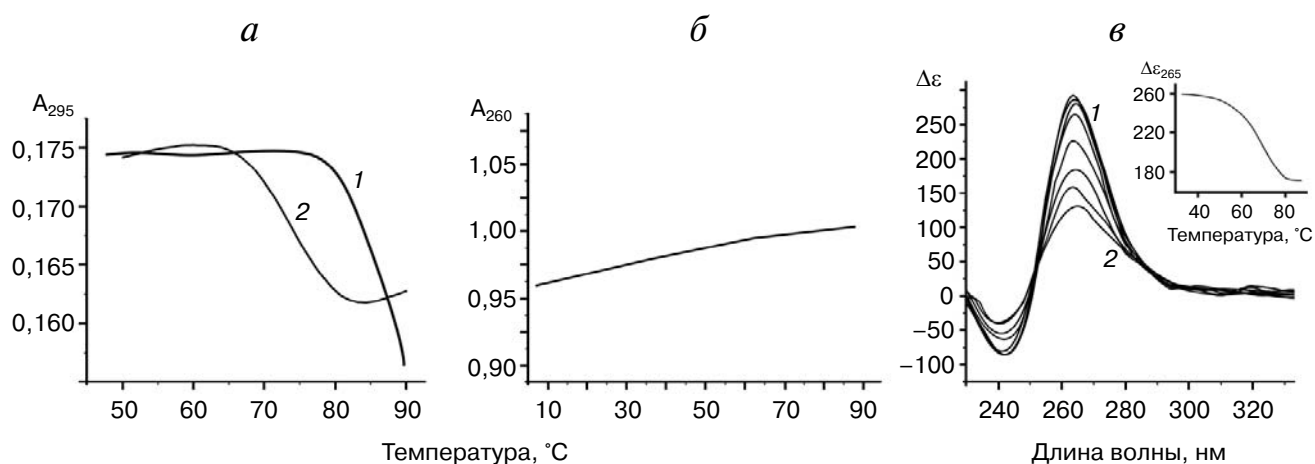


Рис. 2. Термодинамическая стабильность и топология трехтетрадных G₄. а – Кривые температурной зависимости УФ-поглощения (кривые УФ-плавления) при 295 нм олигонуклеотидов d(GGGT)₄ (1) и d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG) (2); б – кривые УФ-плавления d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG) при 260 нм. (в) Спектры КД d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-ТА-ССAGTG), измеренные при разных температурах, начиная от 37 (1) и заканчивая 83° (2); промежуточные значения температур, соответствующие спектрам КД в порядке уменьшения амплитуды положительной полосы, составляли 45, 53, 61, 69, 75 и 79°. Врезка: профиль плавления олигонуклеотида, полученный из данных КД при 265 нм. Все измерения проводили в буфере А

ти, фланкирующие G_4 -мотив, не могут образовывать двойную спираль из-за пространственной удаленности. Поэтому эти последовательности только дестабилизируют внутримолекулярный параллельный G-квадруплекс. Для сравнения на рис. 3, б приведена структура антипараллельного G_4 , который сосуществует с дуплексным доменом, образованным фланкирующими G_4 -мотив последовательностями.

Характеристика G-квадруплекса, образованного олигонуклеотидом $d(GGT)_4$; влияние ионов

одновалентных металлов на устойчивость вторичной структуры. Микросателлитный повтор $d(GGT/ACC)$ является наиболее распространенным среди тринуклеотидных повторов в геноме человека [30]. Тем не менее экспериментального изучения конформационного потенциала $d(GGT)_n$ практически не проводилось. Полученные нами данные УФ-плавления олигонуклеотида $d(GGT)_4$ при 295 нм свидетельствуют о том, что он образует в буфере А G-квадруплекс с $T_{пл} 40^\circ$ (рис. 4, а). Хотя вид кривой плавления соответствовал кооперативному структурному переходу, величина гипохромного эффекта сильно зависела от условий пробоподготовки (времени отжига, длительности выдерживания образца при низкой температуре, олигонуклеотидной концентрации), варьируя от 11 до 22%, что указывает на наличие нескольких квадруплексных конформаций, которые медленно переходят друг в друга. Это предположение поддерживается данными КД. По виду спектра преобладающей является параллельная G_4 -топология, но наличие плеча при 287 нм свидетельствует о возможном образовании и других квадруплексных конформаций (рис. 4, б). Отсутствие

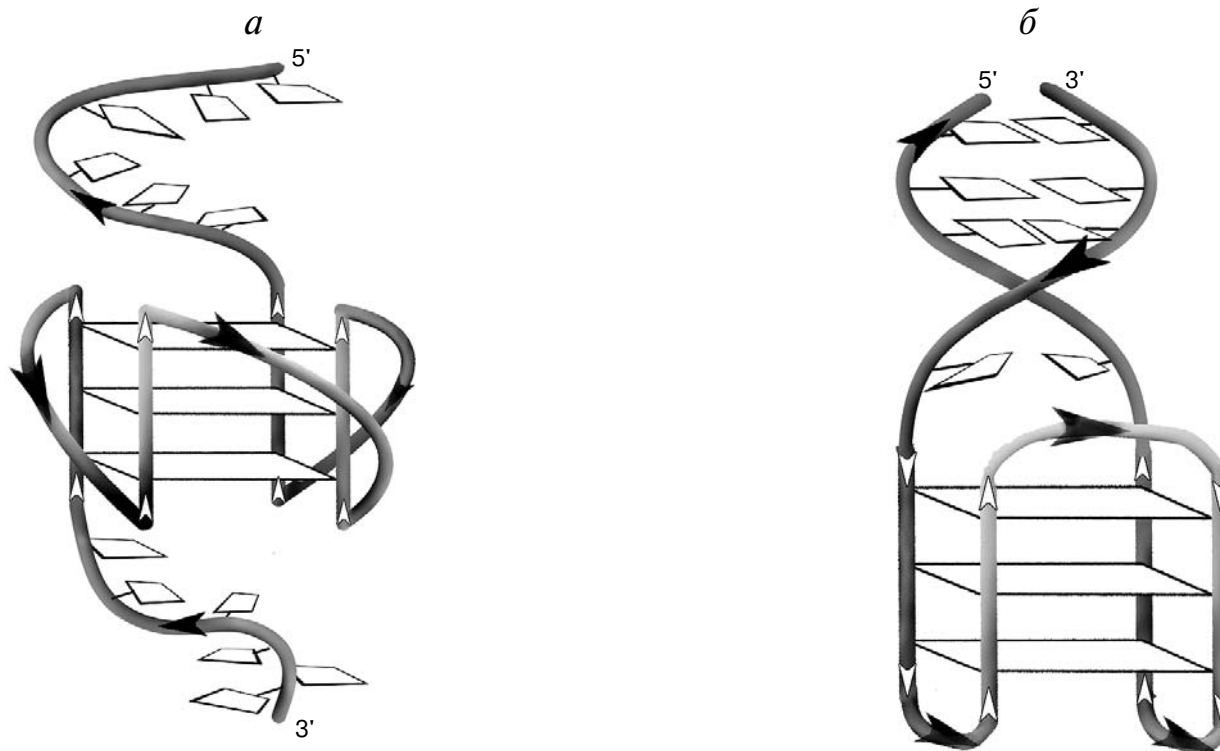


Рис. 3. Предполагаемая вторичная структура, образуемая при внутримолекулярном складывании $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$ (а). Для сравнения приведена структура антипараллельного G_4 , который сосуществует с дуплексным доменом, образованным при гибридизации фланкирующих G_4 -мотив последовательностей (б)

четких изодихроичных точек в серии спектров КД, записанных при разных температурах, подтверждает образование нескольких структурных форм олигонуклеотидом $d(\text{GGT})_4$.

Известно, что параллельные G_4 имеют тенденцию к слипанию друг с другом за счет стэкинг-взаимодействия концевых G-тетрад [31, 32]. Однако в случае $d(\text{GGT})_4$ в условиях нашего эксперимента димеризации квадруплексов не происходит. О внутримолекулярном комплексообразовании этого олигонуклеотида свидетельствует отсутствие зависимости температуры плавления от олигонуклеотидной концентрации, которая менялась в диапазоне 5,3–70 мкМ.

Для изучения влияния ионов одновалентных металлов на образование и стабилизацию параллельных G-квадруплексов только с двумя G-тетрадами были определены кривые плавления олигонуклеотида $d(\text{GGT})_4$ при 295 нм в буферных растворах Б, В и Г, отличающихся содержанием ионов K^+ и Na^+ . Характер кривых плавления образцов в буфере Б, не содержащем ионов одновалентных металлов или содержащем только ионы калия в диапазоне концентрации 5–750 мкМ, свидетельствовал о том, что G-квадруплекс собирался лишь частично (рис. 5, а). Если квадруплексные структуры и зарождались, то они были неустойчивы при комнатной температуре. Следует отметить, что в этой серии $T_{пл}$ оценивалась приблизительно, так как выхода на низкотемпературное плато не наблюдалось; условная температура плавления составляла 18° независи-

мо от состава раствора, а гипохромный эффект не превышал 6–8%. В отличие от буфера Б, буферные растворы В содержали 20 мМ NaCl, а концентрация KCl менялась от 4 до 546 мМ. Показано, что только при переходе к 103 мМ K^+ наблюдалось резкое изменение характера кривых плавления: гипохромный эффект увеличился до 20%, а $T_{пл}$ достигала 55°. Дальнейшее повышение концентрации KCl приводило к стабилизации квадруплекса (рис. 5, б). Для сравнения на рис. 5, б приведена суперпозиция кривых температурной зависимости олигонуклеотидных растворов в буфере В, отличающихся содержанием ионов калия (до и после порогового значения). Чтобы определить роль Na^+ в стабилизации квадруплексной структуры в следующей серии экспериментов мы увеличили концентрацию NaCl до 120 мМ, которая оставалась постоянной в этой серии (буфер Г). Увеличение концентрации NaCl сделало возможным образование G_4 уже при 14 мМ концентрации ионов K^+ , которая более чем в 7 раз ниже, чем в случае образцов в буфере В, в которых концентрация NaCl составляла 20 мМ. Дальнейшее добавление KCl до концентрации 307 мМ приводило к стабилизации квадруплексной структуры. На рис. 5, в приведена линейная зависимость $T_{пл} - \ln[K^+]$ для образцов в буфере Г, содержащем 120 мМ NaCl.

Комплексообразование олигонуклеотидов, содержащих повтор (GT). Набор синтезированных соединений (4–14) широко различался по коли-

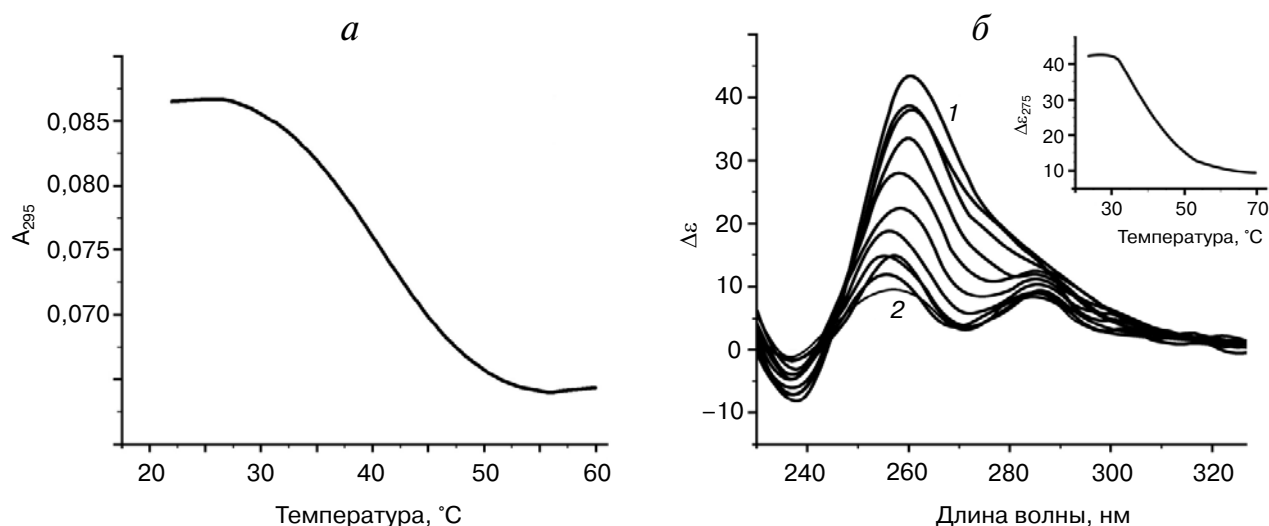


Рис. 4. Термодинамическая стабильность и топология битетрадного G_4 , образованного олигонуклеотидом $d(\text{GGT})_4$. а – Кривая УФ-плавления при 295 нм; б – спектры КД, измеренные при разных температурах, начиная от 24 (1) и заканчивая 69° (2); промежуточные значения температур, соответствующие спектрам КД в порядке уменьшения амплитуды положительной полосы, составляли 29, 34, 39, 44, 49, 54, 59, 64°. Врезка: профиль плавления олигонуклеотида, полученный из данных КД при 275 нм. Все измерения проводили в буфере А

честву динуклеотидных повторов (от 11 до 31). Некоторые олигонуклеотиды содержали 6–7-звенные взаимно комплементарные фрагменты, присоединенные к 5'- и 3'-концам $d(GT)_n$ через моно(ди)нуклеотидные линкеры разного состава. Дизайн таких систем был предпринят для того, чтобы понять, какие факторы могут влиять на образование вторичных структур повторяющейся последовательностью $(GT)_n$, и вообще, образуются ли такие структуры в условиях, которые, как было показано выше, способствуют внутримолекулярной сборке параллельных G-квадруплексов повторами (GGT) и (GGGT). Кривые температурной зависимости УФ-поглощения $d(GT)_n$ и его аналогов в буфере А при 295 нм показали небольшой гипохромный эффект – 6–7% для олигонуклеотидов, не содержащих фланкирующие GT-повтор последовательности, и 3–4% для содержащих такие последовательности. Этот факт является очень важным, так как свидетельствует о том, что понижение оптической плотности образца при нагревании связано с конформационным состоянием именно (GT)-повторов, а присутствие фланкирующих последовательностей только уменьшает этот эффект. На рис. 6, а в качестве примера приведена кривая плавления олигонуклеотида $d(GT)_{16}$. Для сравнения, при нагревании неструктурированного олигомера случайной первичной структуры (15) при 295 нм наблюдается незначительное некооперативное увеличение оптической плотности за счет ослабления стэкинг-взаимодействия оснований с ростом температуры (данные не показаны). Кривые плавления $d(GT)_n$, отра-

жающие слабокооперативный конформационный переход, похожи на профили температурной зависимости УФ-поглощения (295 нм) олигонуклеотида $d(GGT)_4$ в буфере Б, не содержащем ионов одновалентных металлов или содержащих K^+ в очень низких (до 750 мкМ) концентрациях (ср. рис. 5, а и 6, а). Можно предположить, что повторы $(GT)_n$ образуют частично собранные квадруплексные структуры, но в отличие от систем с двумя $(d(GGT)_4)$ или тремя $(d(GGGT)_4)$ G-тетрадами в квадруплексном коре, присутствие ионов K^+ и Na^+ в физиологических концентрациях не стабилизирует эти конформации. По-видимому, наличие тиминных остатков мешает G-тетрадам образовывать полноценные стэкинг-контакты (на расстоянии 3,3–3,4 Å) и удерживать ионы калия, которые даже в случае локализации в квадруплексном коре не способны из-за стерической удаленности формировать координационные связи с оксо-группами гуанинов соседних G-тетрад и стабилизировать четырехспиральную структуру. О справедливости высказанного предположения свидетельствовал низкий уровень кооперативности процесса плавления и отсутствие зависимости условной $T_{пл}$ (12°) от числа динуклеотидных повторов. Кроме того, увеличение концентрации ионов K^+ до 100 мМ не приводило к увеличению стабильности вторичной структуры, образованной $d(GT)_n$. Анализ температурной зависимости УФ-поглощения олигонуклеотидов при 260 нм показал, что самокомплементарные последовательности, фланкирующие $d(GT)_n$, не образуют дуплексные структуры (отсутствие S-об-

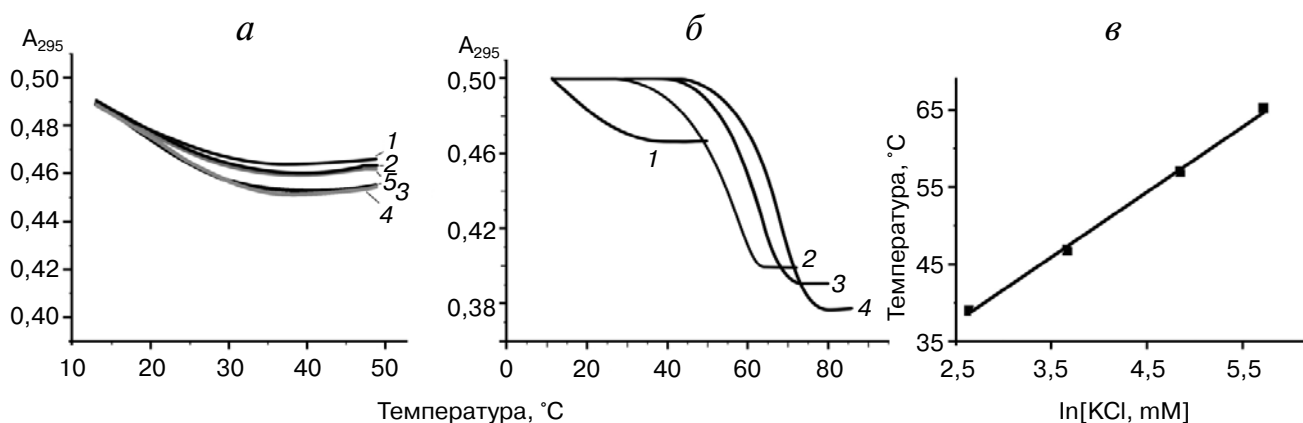


Рис. 5. Влияние ионов одновалентных металлов на образование битетрадных G_4 олигонуклеотидов $d(GGT)_4$. а – Нормированные к одинаковой исходной оптической плотности кривые УФ-плавления (при 295 нм) растворов олигонуклеотида в буфере Б, не содержащем ионов натрия, при разных концентрациях K^+ : 0 (1), 5 мкМ (2), 30 мкМ (3), 150 мкМ (4), 750 мкМ (5); б – нормированные к одинаковой исходной оптической плотности кривые УФ-плавления (при 295 нм) растворов олигонуклеотида в буфере В, содержащем 20 мМ концентрацию NaCl, при различных концентрациях ионов калия: 36 мМ (1), 103 мМ (2), 258 мМ (3), 546 мМ (4); в – зависимость $T_{пл}$ G-квадруплексов в буфере Г, содержащем 120 NaCl, от $\ln[K^+]$

разного перехода спираль–клубок). Согласно спектрам КД, полученным при разных температурах для всего набора соединений с динуклеотидными повторами, ориентация цепей в предполагаемом G-квадруплексе параллельна (рис. 6, б). Хотя следует отметить, что максимум положительной полосы структурированных олигомеров не соответствует 260 нм, а смещен в длинноволновую область, причем с ростом температуры bathochromный сдвиг спектра КД продолжается. Такое поведение нехарактерно для стандартных G-квадруплексных систем.

Влияние G-квадруплекс-образующих олигонуклеотидов на активность топоизомеразы I. Было изучено влияние гуанин-богатых ди-, три- и тетрануклеотидных повторов на способность топоизомеразы I вызывать релаксацию плазмидной ДНК рUC19 путем обратимого расщепления одной из цепей двойной спирали, а также проведено сопоставление стабильности формируемого повторяющейся последовательностью G-квадруплекса с его ингибирующей способностью. Для этого охарактеризованные олигонуклеотиды в разных концентрациях добавляли в реакционную смесь, содержащую ядерный экстракт клеток HeLa и субстрат топоизомеразы I. За процессом перехода плазмиды рUC19 в релаксированное состояние следили методом электрофореза в агарозном геле, учитывая, что электрофоретическая подвижность сверхспирализованного топоизомера существенно выше подвижности релаксированного или разорванного кольца. Предварительно были проведены тесты на топоизомеразную активность получен-

ного ядерного экстракта клеток HeLa, в которых был использован высокоселективный ингибитор фермента, камптотecin [33]. Полученные данные подтвердили, что релаксация сверхспирализованной плазмиды происходит под действием именно топоизомеразы I, а не какого-либо другого ядерного белка. Оценку степени ингибирования активности топоизомеразы I в присутствии олигонуклеотидов, содержащих G₄-мотивы, рассчитывали с помощью уравнения (1). Олигонуклеотиды d(GGGT)₄, d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-TA-CCAGTG), d(GGT)₄, d(GT)₁₆, а также другие олигомеры, содержащие GT-повторы, добавляли в реакционную смесь до конечной концентрации, меняющейся в диапазоне 0,05–12,5 мкМ. Олигомер случайной последовательности (15), не образующий квадруплексную структуру, использовался в качестве контроля. Наиболее сильный ингибирующий эффект был выявлен для d(GGGT)₄ и d(CACTGG-CC-(GGGT)₄-TA-CCAGTG), которые начинали оказывать влияние на способность топоизомеразы I снижать плотность сверхспирализации ДНК уже при 0,05 мкМ концентрации (рис. 7, а, б). Менее эффективным оказался d(GGT)₄; для достижения примерно такого же уровня ингибирования требовалось примерно в 10 раз больше этого олигонуклеотида, чем d(GGGT)₄ (рис. 7, в). Добавление контрольного олигомера (15) не оказывало влияния на активность топоизомеразы; даже при 12,5 мкМ концентрации он не ингибировал переход сверхспирализованной плазмиды в релаксированное состояние (рис. 7, г). В случае олигонуклеотидов, содержащих GT-пов-

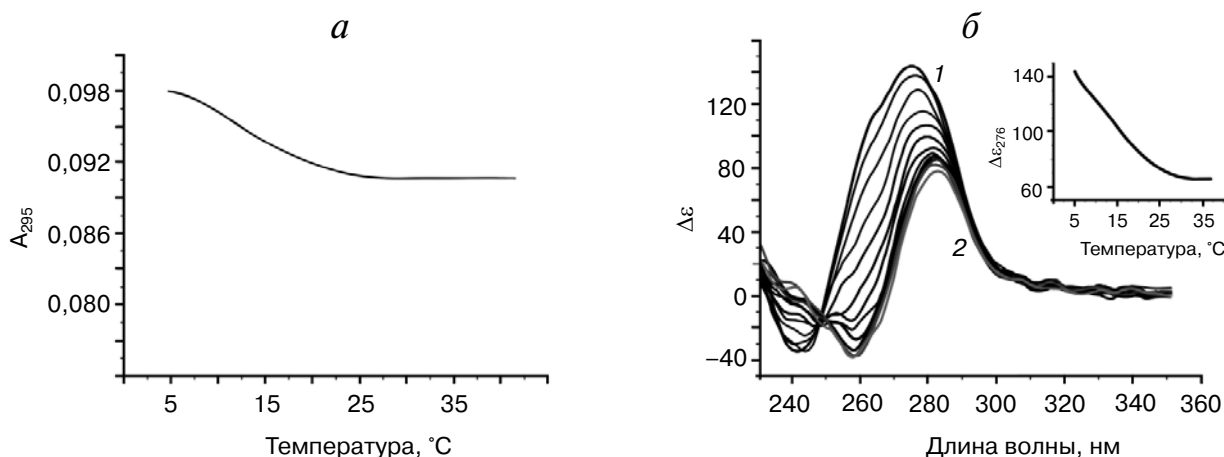


Рис. 6. Анализ вторичной структуры, образованной олигонуклеотидом d(GT)₁₆. а – Кривая УФ-плавления при 295 нм; б – спектры КД, измеренные при разных температурах, начиная от 5 (1) и заканчивая 38° (2); промежуточные значения температур, соответствующие спектрам КД в порядке уменьшения амплитуды положительной полосы, составляли 9, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35°. Врезка: профиль плавления олигонуклеотида, полученный из данных КД при 276 нм. Все измерения проводили в буфере А

торы, ингибирования топоизомеразной активности тоже не наблюдалось (рис. 7, д). Количество динуклеотидных повторов и наличие фланкирующих GT-мотив фрагментов не влияло на полученные результаты. Найденные закономерности хорошо согласуются с нашими данными о стабильности вторичных структур, образуемых $d(GT)_n$. Даже если G-квадруплекс частично складывается при охлаждении пробы, его $T_{пл}$ намного ниже 37° , температуры, при которой мы изучали активность топоизомеразы I.

Для количественной оценки ингибирующего действия G-квадруплексных структур полученные электрофореграммы были обчислены с помощью программы ImageJ. На основании построенных кривых зависимости уровня ингибирования активности фермента от логарифма концентрации олигонуклеотида, добавленного в реакционную смесь, была определена концентрация G_4 -образующих олигомеров, которые ингибируют топоизомеразу I на 50% (IC_{50}): $0,63 \pm 0,06$, $0,12 \pm 0,02$ и $0,08 \pm 0,01$ мкМ для $d(GGT)_4$, $d(GGGT)_4$ и $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$ соответственно (рис. 8). Видно,

что наиболее выраженное ингибирующее действие на топоизомеразу оказывает олигонуклеотид $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$, температура плавления которого на 12° ниже, чем $T_{пл}$ незамещенного $d(GGGT)_4$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С помощью физико-химических методов мы показали, что олигонуклеотиды $d(GGGT)_4$ и $d(GGT)_4$, имитирующие одну из цепей микросателлитных повторов, образуют в буфере А внутримолекулярные параллельные G_4 с пропеллерными петлями с $T_{пл}$ более 85 и 40° соответственно. Маркером квадруплексной структуры служил характер температурной зависимости УФ-поглощения образца при 295 нм (наличие гипохромного эффекта). О внутримолекулярном комплексообразовании $d(GGGT)_4$ и $d(GGT)_4$ свидетельствовало отсутствие зависимости $T_{пл}$ от олигонуклеотидной концентрации. Параллельная топология образующихся G_4 доказана методом КД. Полученные данные не противо-

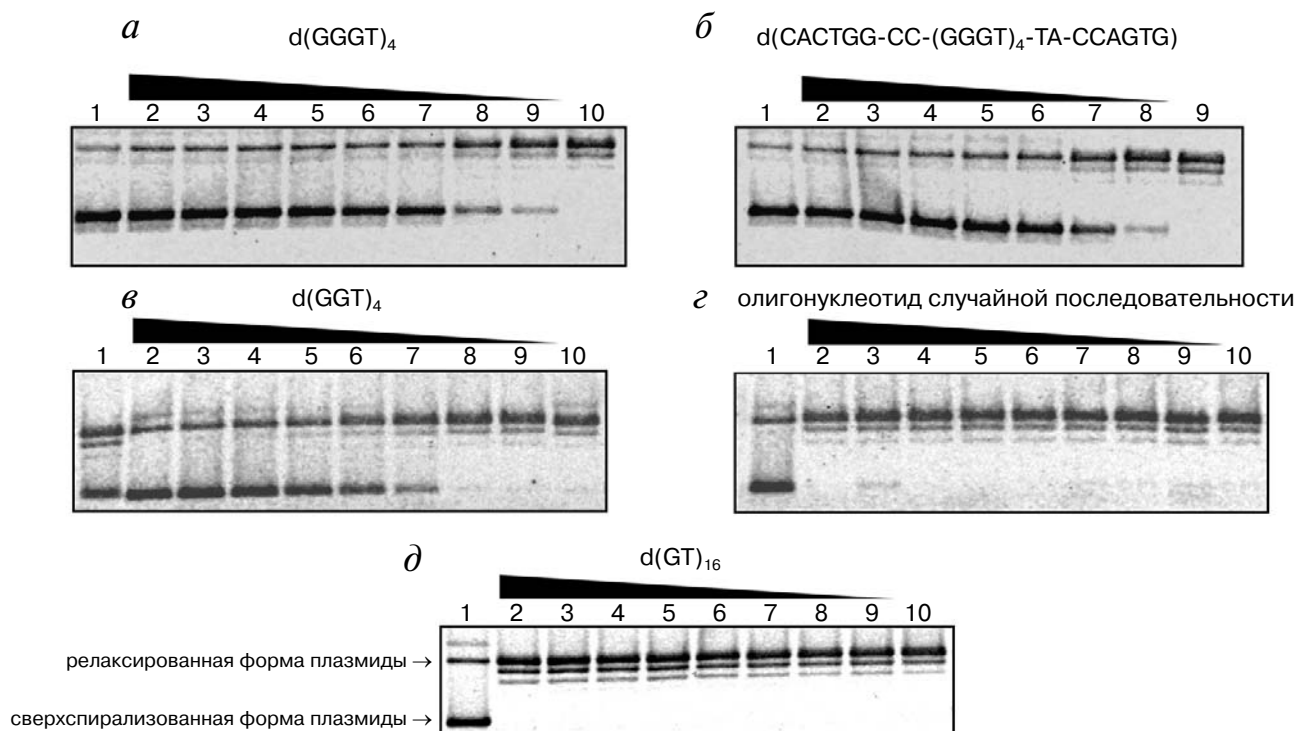


Рис. 7. Переход сверхспирализованной плазмиды pUC19 в релаксированную форму под действием топоизомеразы I в присутствии олигонуклеотидов. *a* – $d(GGGT)_4$; *б* – $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$; *в* – $d(GGT)_4$; *г* – олигонуклеотид случайной последовательности; *д* – $d(GT)_{16}$. Электрофореграмма продуктов ферментативной реакции в 1%-ном агарозном геле; концентрация (мкМ) олигонуклеотидов составляла 12,5 (2), 10 (3), 5 (4), 2,5 (5), 1,0 (6), 0,5 (7), 0,1 (8), 0,05 (дорожка 9), 0 (10). (1) соответствовала реакционной смеси, не содержащей фермента. Для визуализации ДНК гель окрашивали бромистым этидием. Положения сверхспирализованной и релаксированной плазмид указаны слева на панели (д)

речат литературным, согласно которым внутримолекулярные квадруплексы с тремя однонуклеотидными петлями имеют параллельную топологию независимо от нуклеотидного состава петель [34, 35]. Следует отметить, что в литературе данные о структуре G_4 , образованного $d(GGGT)_4$, долгое время оставались противоречивыми. В [36] ее описывали как антипараллельный квадруплекс, стабилизированный двумя тетрадами $G \cdot G \cdot G \cdot G$ и одной $G \cdot T \cdot G \cdot T$. И только недавно методами молекулярной динамики [37], ЯМР-спектроскопии [31], термодинамического анализа [38] и флуоресценции [39] было показано, что последовательность $d(GGGT)_4$, которая рассматривалась как аптамер для связывания с интегразой ВИЧ-1, складывается в параллельный G_4 . Ключевая черта этого квадруплекса – чрезвычайно высокая термодинамическая стабильность, обеспечивающая сохранение квадруплексной структуры даже в присутствии комплементарной цепи [39].

В работе 2014 г. [40] было отмечено, что добавление двух нуклеотидных остатков GC к 5'-концу $d(GGGTGGGTGGGTGGG)$ не влияет на параллельную топологию образующегося G_4 , но приводит к его дестабилизации. В нашем исследовании шестизвенные комплементарные участки были присоединены через короткие линкеры к обоим концам аналогичной последовательности. Впервые показано, что формирования дуплексного домена при этом не происходит, а наличие фланкирующих G_4 -мотив участков значительно (более чем на 12°) дестабилизирует квадруплексную структуру. Наблюдаемый эффект вызван стерической несовместимостью дуплексного домена со структурой параллельно-

го квадруплекса: при его образовании дуплексобразующие цепи разнесены в пространстве, что не позволяет им гибридизоваться (рис. 3, а). В отличие от $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$ при внутримолекулярном складывании олигонуклеотидного тромбин-связывающего аптамера $d(CACTGGTAGGTTGGTGTG-GTTGGGGCCAGTG)$ образуется антипараллельный G-квадруплекс, который сосуществует с ДНК-дуплексом. При этом оба структурных домена оказывают значительное влияние друг на друга [29].

Вторичная структура, образованная олигонуклеотидом $d(GGT)_4$, слабо изучена. Ранее ее описывали как самоассоциат, который формируется лишь в присутствии ионов калия и магния [41]. В недавней работе последовательность $d(GGT)_4$ составляла часть олигонуклеотида (противоопухолевого аптамера), в котором она была соединена через динуклеотидный линкер с четырьмя повторами (TGG) [42]. Используя ЯМР-спектроскопию, КД и хроматографические методы, авторы показали, что этот олигонуклеотид складывается в 8 мономерных параллельных квадруплексных структур, находящихся в равновесии друг с другом. Эти наблюдения не противоречат полученным нами результатам, согласно которым $d(GGT)_4$ образует несколько различных G_4 параллельной топологии, причем все они являются продуктами внутримолекулярного складывания. Следует отметить, что устойчивые квадруплексы с двумя G-тетрадами обычно имеют антипараллельную структуру, например, G_4 , образованные тромбин-связывающими аптамерами [29, 43] или некоторыми теломерными повторами [44]. Поэтому охарактере-

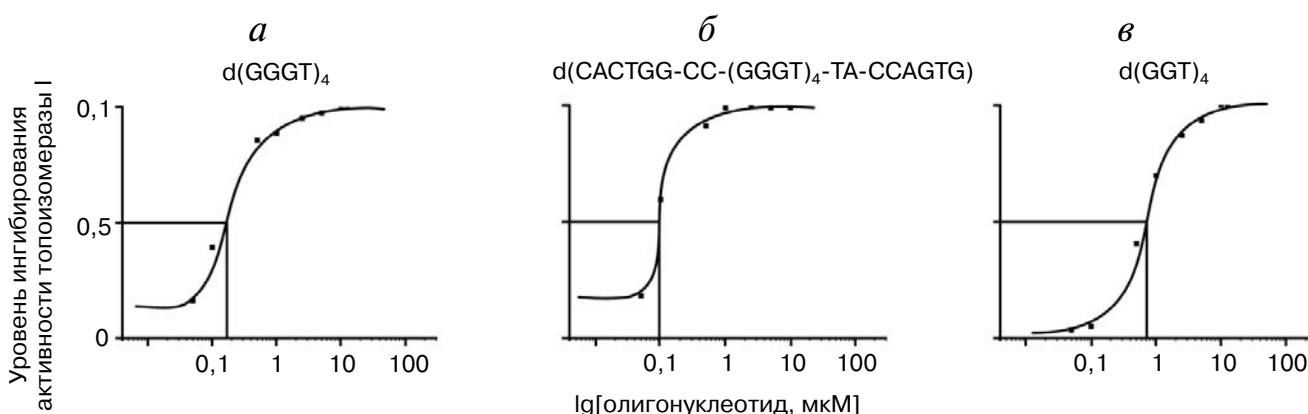


Рис. 8. Ингибирование активности топоизомеразы I олигонуклеотидами. а – $d(GGGT)_4$; б – $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$; в – $d(GGT)_4$. Кривые зависимости уровня ингибирования активности фермента от логарифма концентрации олигонуклеотида построены на основании электрофоретических данных (рис. 7) с помощью программы ImageJ («National Institutes of Health», США)

ризованные в нашей работе битетрадные параллельные квадруплексы с $T_{пл}$ 40° вызывают особый интерес. Следует отметить, что параллельные G_4 , образованные протяженными микросателлитными локусами, могут образовывать гирлянду квадруплексов на G-богатой цепи, как это было постулировано для минисателлитных повторов [45]. В рамках нашей работы с помощью УФ-плавления было определено минимальное количество одновалентных ионов, необходимых для полного складывания олигонуклеотида $d(GGT)_4$ в параллельный квадруплекс. Известно, что G_4 чувствительны к типу катионов в окружающей среде и их концентрации [46]. Наиболее сильное стабилизирующее действие оказывают ионы одновалентных металлов, особенно K^+ , размеры которого позволяют ему внедряться в полость G_4 , располагаясь между соседними G-тетрадами [35, 47].

В настоящей работе в трех сериях экспериментов концентрация ионов калия варьировала в широком диапазоне на фоне постоянной концентрации ионов натрия; значения последней отличались у разных экспериментальных серий — 0, 20, 120 мМ. Показано, что сборка полноценных G_4 не происходит, если буферный раствор содержит только ионы K^+ в диапазоне концентраций 5–750 мкМ. В условиях эксперимента ДНК имеет заряд -1 на каждый межнуклеотидный фосфатный остаток, т.е. концентрация отрицательных зарядов на олигонуклеотиде $d(GGT)_4$ (чья концентрация составляла $9,4 \times 10^{-6}$ М) равна ~ 103 мкМ. Очевидно, что объемная концентрация ионов, не превышающая 750 мкМ, недостаточна для экранирования зарядов фосфатных групп и специфического связывания в полости квадруплекса. Хотя образование элементов квадруплекса за счет склонности G-трактов к образованию G-тетрад наблюдалось при пониженной температуре даже в условиях полного отсутствия ионов металлов (рис. 5, а); этот феномен отмечен и при сборке антипараллельных битетрадных квадруплексов [48]. Нами показано, что в сериях растворов $d(GGT)_4$ в буферах В и Г, содержащих постоянные концентрации ионов натрия, которые участвуют в экранировании зарядов фосфатных групп, пороговые значения концентрации ионов K^+ , способствующие внутримолекулярному складыванию олигонуклеотидов в G-квадруплекс, зависят от концентрации Na^+ : 103 мМ K^+ в присутствии 20 мМ NaCl и 14 мМ K^+ в присутствии 120 мМ NaCl. Дальнейшее повышение концентрации K^+ приводит к стабилизации G_4 (рис. 5, б, в).

Вторичные структуры, образуемые олигонуклеотидами, которые содержат повторяющиеся последовательности GT, были изучены в ра-

ботах Калюжного и сотр. [49, 50]. Согласно интерпретации авторов, они складываются в малоустойчивые квадруплексные структуры, причем, способность к формированию G_4 , как было показано, зависела от длины повтора. Однако данные, полученные с помощью КД и флуоресцентных методов, не позволяли делать однозначные выводы о существовании квадруплексов, в частности, для олигонуклеотида $d(GT)_{12}$. В нашей работе на серии олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих в своем составе GT-повторы, показано, что они не образуют полноценные G-квадруплексы. Стабильность частично собранных G_4 -подобных структур не зависела от длины динуклеотидного повтора, наличия фланкирующих последовательностей и концентрации одновалентных ионов. Отсутствие ингибирующего влияния этих олигомеров на топоизомеразу I также свидетельствует о том, что они не образуют устойчивых в условиях ферментативной реакции квадруплексов, а топоизомераза не инициирует сборку таких структур.

Известно, что многочисленные клеточные белки специфически узнают G-квадруплексы [4], что может приводить как к их расплетанию [51–53], так и к стабилизации [54–57], и даже к инициации сборки квадруплексов (в этом случае белки выполняют функции молекулярных шаперонов) [48, 58]. Объектом нашего интереса являлась топоизомераза I — широко распространенный многофункциональный фермент, который регулирует топологическое состояние ДНК в ходе транскрипции, репликации, хромосомной конденсации и рекомбинации путем обратимого расщепления одной из цепей ДНК-дуплекса и релаксации сверхспирализованной ДНК [59]. Показано, что топоизомераза I является одним из важных внутриклеточных мишеней противоопухолевых препаратов [21]. Топоизомераза I способна узнавать и связываться с некоторыми неканоническими формами ДНК — структурами Холлидея, ДНК-триплексами, G-квадруплексами [19, 20, 60, 61]. В частности, аффинность этого фермента значительно выше к одноцепочечным ДНК, образующим G_4 , чем к олигонуклеотидам случайной последовательности [19, 20, 62]. Показано, что межмолекулярные и внутримолекулярные G_4 могут ингибировать опосредованное топоизомеразой I расщепление ДНК [19]. Этот эффект наблюдался и для олигонуклеотидов, несущих повторяющиеся G-тракты, но не образующих стабильные квадруплексные структуры [19, 20]. Более того, как было показано, топоизомераза I способна индуцировать формирование межмолекулярных параллельных G_4 олигонуклеотидами, содержащими участки из пяти идущих подряд гуанозинов [62]. Однако

набор описанных в литературе ДНК- и РНК-моделей был случайным, а среди внутримолекулярных G_4 преобладали антипараллельные квадруплексы. Мы впервые сопоставили стабильность образуемых микросателлитными повторами параллельных G_4 и их способность ингибировать релаксацию сверхспирализованных плазмидных ДНК топоизомеразой I.

В нашей работе показано сильное ингибирующее действие параллельных G-квадруплексов, образованных олигонуклеотидами $d(GGT)_4$ и $d(GGGT)_4$, на активность топоизомеразы I. Причем ингибирующий эффект проявлялся при значительно меньших концентрациях квадруплексных «ловушек» (нано(микро)молярных), чем ранее исследованных антипараллельных G_4 [20] (рис. 7, 8). Способность олигонуклеотидов $d(GGGT)_4$ и $d(GGT)_4$ ингибировать активность топоизомеразы I хорошо коррелировала со стабильностью образуемых ими G-квадруплексных структур и числом остатков гуанозина в повторе. В работе [62], в которой анализировали влияние олигонуклеотидов $d(GGGGGT)_4$ и $d(GGGT)_4$ на активность топоизомеразы I, также показано, что чем длиннее G-тракт в повторяющейся последовательности, тем более эффективно ингибируется фермент. Однако сравнительный анализ полученных нами данных с литературными затруднялся тем, что тип и стабильность квадруплексов в [62] не изучались, а структура G_4 , образованного $d(GGGT)_4$, ошибочно описывалась как антипараллельная. К тому же, методические подходы, использованные для оценки активности топоизомеразы I в нашей работе и в [62], были совершенно разными.

Сравнительное изучение $d(GGGT)_4$ и его производного, содержащего шестинуклеотидные фрагменты, присоединенные к 5'- и 3'-концам G_4 -мотива, показало, что наиболее эффективное ингибирование топоизомеразы наблюдается для $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$, хотя $T_{пл}$ образуемого им G_4 существенно ниже, чем $T_{пл}$ квадруплекса, образованного $d(GGGT)_4$. Это кажущееся противоречие может объясняться большей динамической гибкостью системы, содержащей квадруплекс-дестабилизирующие элементы, что позволяет ферменту легче адаптировать его структуру к особенностям сайта связывания олигонуклеотидного лиганда, чем структуру экстремально устойчивого $d(GGGT)_4$. В работе [20] показано, что повышенным ингибирующим эффектом обладают G_4 -мотивы, которые фланкированы дуплекс-образующими

олигонуклеотидами, причем наиболее благоприятными для ингибирования являются дуплексные домены, содержащие 6 нуклеотидных пар. Однако G_4 в этой работе имели антипараллельную топологию, допускающую образование дуплекса, способного поддержать квадруплексную структуру (рис. 3, б). Поэтому причины повышенного ингибирующего эффекта таких составных олигонуклеотидов могут отличаться от постулированных нами.

Олигонуклеотиды с повторами GT, как было показано, не ингибируют топоизомеразу I независимо от их длины и наличия фланкирующих фрагментов и ведут себя как контрольный олигомер случайной последовательности (рис. 7, з, д). По-видимому, фермент не узнает частично сформированных G_4 низкой термодинамической устойчивости и не способствует конформационному сдвигу к квадруплексным структурам, как это наблюдалось для олигонуклеотидов, содержащих несколько идущих подряд остатков гуанозина [62].

Таким образом, показано, что олигонуклеотиды $d(GGGT)_4$ и $d(GGT)_4$ специфически связываются с топоизомеразой I, ингибируя релаксацию сверхспирализованной ДНК. При этом степень влияния олигонуклеотидов на активность топоизомеразы коррелирует со стабильностью образуемых ими G-квадруплексов. Однако в случае сверхпрочного G_4 , формируемого $d(GGGT)_4$, факторы, уменьшающие термодинамическую стабильность структуры, способствуют усилению ингибирующего действия лиганда. Так, максимальные ингибирующие свойства в изученной серии олигонуклеотидов проявил $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$, содержащий фланкирующие G_4 -мотив последовательности, которые не гибридизуются при параллельной топологии квадруплексов. Когда же число остатков гуанозина в повторах уменьшается до одного ($d(GT)_n$), то формирующиеся несовершенные (из-за мешающего влияния альтернирующих остатков тимидина) G-квадруплексы с низкой термодинамической стабильностью не распознаются топоизомеразой I, а присутствие фермента в реакционной смеси не сдвигает равновесие в сторону образования олигонуклеотидами $d(GT)_n$ полноценной квадруплексной конформации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-91343_ННИО_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brandstrom, M., Bagshaw, A.T., Gemmell, N.J., and Ellegren, H. (2008) The relationship between microsatellite polymorphism and recombination hot spots in the human genome, *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 2579–2587.
- Boland, C.R., and Goel, A. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer, *Gastroenterology*, **138**, 2073–2087.
- Neidle, S. (2009) The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 239–250.
- Sissi, C., Gatto, B., and Palumbo, M. (2011) The evolving world of protein-G-quadruplex recognition: a medicinal chemist's perspective, *Biochimie*, **93**, 1219–1230.
- Wu, Y., and Brosh, R.M., Jr. (2010) G-quadruplex nucleic acids and human disease, *FEBS J.*, **277**, 3470–3488.
- Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., and Balasubramanian, S. (2013) Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells, *Nature Chem.*, **5**, 182–186.
- Henderson, A., Wu, Y., Huang, Y.C., Chavez, E.A., Platt, J., Johnson, F.B., Brosh, R.M., Jr., Sen, D., and Lansdorp, P.M. (2014) Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 860–869.
- Biffi, G., Di Antonio, M., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2014) Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells, *Nature Chem.*, **6**, 75–80.
- Hershman, S.G., Chen, Q., Lee, J.Y., Kozak, M.L., Yue, P., Wang L.S., and Johnson, F.B. (2008) Genomic distribution and functional analyses G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 144–156.
- Mani, P., Yadav, V.K., Das, S.K., and Chowdhury, S. (2009) Genome-wide analyses of recombination prone regions predict role of DNA structural motif in recombination, *PLoS One*, **4**, e4399.
- Verma, A., Yadav, V.K., Basundra, R., Kumar, A., and Chowdhury, S. (2009) Evidence of genome-wide G₄ DNA-mediated gene expression in human cancer cells, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4104–4204.
- Lansdorp, P.M. (2005) Major cutbacks at chromosome ends, *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 388–395.
- Tarsounas, M., and Tijsterman, M. (2013) Genomes and G-quadruplexes: for better or for worse, *J. Mol. Biol.*, **425**, 4782–4789.
- Balasubramanian, S., and Neidle, S. (2009) G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 345–353.
- McLuckie, K.I.E., Di Antonio, M., Zecchini, H., Xian, J., Caldas, C., Krippendorff, B.-F., Tannahill, D., Lowe, C., and Balasubramanian, S. (2013) G-quadruplex DNA as a molecular target for induced synthetic lethality in cancer cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 9640–9643.
- de Soultrait, V.R., Lozach, P.Y., Altmeyer, R., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S., and Andreola, M.L. (2002) DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong anti-integrase agents, *J. Mol. Biol.*, **324**, 195–203.
- Teng, Y., Girvan, A.C., Casson, L.K., Pierce, W.M., Jr., Qian, M., Thomas, S.D., and Bates, P.J. (2007) AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin, *Cancer Res.*, **67**, 10491–10500.
- Sun, D., and Hurley, L.H. (2009) The importance of negative superhelicity in inducing the formation of G-quadruplex and i-motif structures in the c-Myc promoter: implications for drug targeting and control of gene expression, *J. Med. Chem.*, **52**, 2863–2874.
- Marchand, C., Pourquier, P., Laco, G.S., Jing, N., and Pommier, Y. (2002) Interaction of human nuclear topoisomerase I with guanosine quartet-forming and guanosine-rich single-stranded DNA and RNA oligonucleotides, *J. Biol. Chem.*, **277**, 8906–8911.
- Shuai, L., Deng, M., Zhang, D., Zhou, Y., and Zhou, X. (2010) Quadruplex-duplex motifs as new topoisomerase I inhibitors, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **29**, 841–853.
- Moukharskaya, J., and Verschraegen, C. (2012) Topoisomerase I inhibitors and cancer therapy, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, **26**, 507–525.
- Rachwal, P.A., Brown, T., and Fox, K.R. (2007) Effect of G-tract length on the topology and stability of intramolecular DNA quadruplexes, *Biochemistry*, **46**, 3036–3044.
- Rachwal, P.A., Brown, T., and Fox, K.R. (2007) Sequence effects of single base loops in intramolecular quadruplex DNA, *FEBS Lett.*, **581**, 1657–1660.
- Rachwal, P.A., Findlow, I.S., Werner, J.M., Brown, T., and Fox, K.R. (2007) Intramolecular DNA quadruplexes with different arrangements of short and long loops, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4214–4222.
- Guedin, A., Gros, J., Alberti, P., and Mergny, J.-L. (2010) How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7858–7868.
- Nitiss, J.L., Soans, E., Rogojina, A., Seth, A., and Mishina, M. (2012) *Topoisomerase Assays*, Author manual, *Curr. Prot. Pharmacol.*, DOI: 10.1002/0471141755.ph0303s57.
- Karsisiotis, A.I., Hessari, N.M., Novellino, E., Spada, G.P., Randazzo, A., and Webba da Silva, M. (2011) Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism, *Angew. Chem.*, **50**, 10645–10648.
- Vorlickova, M., Kejnovska, I., Sagi, J., Renciuik, D., Bednarova, K., Motlova, J., and Kupr, J. (2012) Circular dichroism and guanine quadruplexes, *Methods*, **57**, 64–75.
- Dolinnaya, N.G., Yuminova, A.V., Spiridonova, V.A., Arutyunyan, A.M., and Kopylov, A.M. (2012) Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **30**, 524–531.
- Benson, G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 573–580.
- Do, N.Q., Lim, K.W., Teo, M.H., Heddi, B., and Phan, A.T. (2011) Stacking of G-quadruplexes: NMR structure of a G-rich oligonucleotide with potential anti-HIV and anticancer activity, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9448–9457.
- Krishnan-Ghosh, Y., Liu, D., and Balasubramanian, S. (2004) Formation of an interlocked quadruplex dimer by d(GGGT), *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11009–11016.
- Coletta, A., and Desideri, A. (2013) Role of the protein in the DNA sequence specificity of the cleavage site stabilized by the camptothecin topoisomerase IB inhibitors: a metadynamics study, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9977–9986.
- Guedin, A., De Cian, A., Gros, J., Lacroix, L., and Mergny, J.-L. (2008) Sequence effects in single-base loops for quadruplexes, *Biochimie*, **90**, 686–696.
- Bugaut, A., and Balasubramanian, S. (2008) A sequence-independent study of the influence of short loop lengths on the stability and topology of intramolecular DNA G-quadruplexes, *Biochemistry*, **47**, 689–697.
- Jing, N., Gao, X., Rando, R.F., and Hogan, M.E. (1997) Potassium-induced loop conformational transition of a potent anti-HIV oligonucleotide, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **15**, 573–585.
- Li, M.H., Zhou, Y.H., Luo, Q., and Li, Z.S. (2010) The 3D structures of G-Quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors: molecular dynamics simulations in aqueous solution and in the gas phase, *J. Mol. Model.*, **16**, 645–657.

38. Kelley, S., Boroda, S., Musier-Forsyth, K., and Kankia, B.I. (2011) HIV-integrase aptamer folds into a parallel quadruplex: a thermodynamic study, *Biophys. Chem.*, **155**, 82–88.
39. Johnson, J., Okyere, R., Joseph, A., Musier-Forsyth, K., and Kankia, B. (2013) Quadruplex formation as a molecular switch to turn on intrinsically fluorescent nucleotide analogs, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 220–228.
40. Mathias, J., Okyere, R., Lomidze, L., Gvarjaladze, D., Musier-Forsyth, K., and Kankia, B. (2014) Thermal stability of quadruplex primers for highly versatile isothermal DNA amplification, *Biophys. Chem.*, **185**, 14–18.
41. Chen, F.M. (1997) Supramolecular self-assembly of d(TGG)₄, synergistic effects of K⁺ and Mg²⁺, *Biophys. J.*, **73**, 348–356.
42. Dailey, M.M., Miller, M.C., Bates, P.J., Lane, A.N., and Trent, J.O. (2010) Resolution and characterization of the structural polymorphism of a single quadruplex-forming sequence, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4877–4888.
43. Kelly, J.A., Feigon, J., and Yeates, T.O. (1996) Reconciliation of the X-ray and NMR structures of the thrombin-binding aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG), *J. Mol. Biol.*, **256**, 417–422.
44. Hansel, R., Lohr, F., Trantirek, L., and Dotsch, V. (2013) High-resolution insight into G-overhang architecture, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 2816–2824.
45. Amrane, S., Adrian, M., Heddi, B., Serero, A., Nicolas, A., Mergny, J.L., and Phan, A.T. (2012) Formation of pearl-necklace monomorphous G-quadruplexes in the human CEB25 minisatellite, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5807–5816.
46. Gaynutdinov, T.I., Neumann, R.D., and Panyutin, I.G. (2008) Structural polymorphism of intramolecular quadruplex of human telomeric DNA: Effect of cations, quadruplex-binding drugs and flanking sequences, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4079–4087.
47. Zhang, A.Y.Q., Bugaut, A., and Balasubramanian, S. (2011) A sequence-independent analysis of the loop length dependence of intramolecular RNA G-quadruplex stability and topology, *Biochemistry*, **50**, 7251–7258.
48. Nagatoishi, S., Tanaka, Y., and Tsumoto, K. (2007) Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **352**, 812–817.
49. Калужный Д.Н., Бондарев Ф.С., Щелкина А.К., Лившиц М.А., Борисова О.Ф. (2008) Внутримолекулярные G-квадруплексы, образованные микросателлитной последовательностью d(GT)₁₂ в присутствии ионов K⁺, *Молекулярная биология*, **42**, 693–700.
50. Kaluzhny, D., Shchyolkina, A., Livshits, M., Lysov, Y., and Borisova, O. (2009) A novel intramolecular G-quartet-containing fold of single-stranded d(GT)₈ and d(GT)₁₆ oligonucleotides, *Biophys. Chem.*, **143**, 161–165.
51. Salas, T.R., Petrusseva, I., Lavrik, O., Bourdoncle, A., Mergny, J.L., Favre, A., and Saintome, C. (2006) Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4857–4865.
52. Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, R.M., Jr., Bohr, V.A., and Hickson, I.D. (2001) The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2843–2849.
53. Cogoi, S., Shchekotikhin, A.E., and Xodo, L.E. (2014) HRAS is silenced by two neighboring G-quadruplexes and activated by MAZ, a zinc-finger transcription factor with DNA unfolding property, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8379–8388.
54. Giraldo, R., Suzuki, M., Chapman, L., and Rhodes, D. (1994) Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7658–7662.
55. Jing, N., Marchand, C., Liu, J., Mitra, R., Hogan, M.E., and Pommier, Y. (2000) Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 21460–21467.
56. Paeschke, K., Simonsson, T., Postberg, J., Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2005) Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 847–854.
57. Kang, H.J., Le, T.V., Kim, K., Hur, J., Kim, K.K., and Park, H.J. (2014) Novel interaction of the Z-DNA binding domain of human ADAR1 with the oncogenic c-Myc promoter G-quadruplex, *J. Mol. Biol.*, **426**, 2594–2604.
58. Baldrich, E., and O'Sullivan, C.K. (2005) Ability of thrombin to act as molecular chaperone, inducing formation of quadruplex structure of thrombin-binding aptamer, *Anal. Biochem.*, **341**, 194–197.
59. Gupta, M., Fujimori, A., and Pommier, Y. (1995) Eukaryotic DNA topoisomerases I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1262**, 1–14.
60. Sekiguchi, J., Cheng, C., and Shuman, S. (2000) Resolution of a Holliday junction by vaccinia topoisomerase requires a spacer DNA segment 3' of the CCCTT↓ cleavage sites, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2658–2663.
61. Arimondo, P.B., Moreau, P., Boutorine, A., Bailly, C., Prudhomme, M., Sun, J.S., Garestier, T., and Helene, C. (2000) Recognition and cleavage of DNA by rebeccamycin- or benzopyridoquinoxaline conjugated of triple helix-forming oligonucleotides, *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 777–784.
62. Arimondo, P.B., Riou, J.F., Mergny, J.L., Tazi, J., Sun, J.S., Garestier, T., and Helene, C. (2000) Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4832–4838.

**PARALLEL G-QUADRUPLEXES FORMED
BY GUANINE-RICH MICROSATELLITE REPEATS
INHIBIT HUMAN TOPOISOMERASE I**

**A. M. Ogloblina¹, V. A. Bannikova², A. N. Khristich¹,
T. S. Oretskaya², M. G. Yakubovskaya¹, N. G. Dolinnaya^{2*}**

¹ *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Moscow 115478, Russia; fax: +7(495)324-1205,
E-mail: globbi@mail.ru*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-3181,
E-mail: dolinnaya@hotmail.com*

Received December 15, 2014
Revision received February 16, 2015

Using UV and CD spectroscopy, we studied the thermodynamic stability and folding topology of G-quadruplexes (G_4), formed by G-rich fragments in human microsatellites differing in the number of guanines within the repeating unit. The oligonucleotides $d(GGGT)_4$ and $d(GGT)_4$ were shown to form propeller-type parallel-stranded intramolecular G-quadruplexes. The G_4 melting temperature is dramatically decreased (by more than 45°C) in the transition from the tri-G-tetrad to the bi-G-tetrad structure. The $d(GT)_n$ repeats do not form perfect G-quadruplexes (one-G-tetrad); folded G_4 -like conformation is not stable at room temperature and is not stabilized by monovalent metal ions. The minimum concentration of K^+ ions that promotes quadruplex folding of $d(GGT)_4$ was found to depend on the supporting Na^+ ion concentration. We demonstrated for the first time that the complementary regions flanking G_4 -motifs (as in $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$) cannot form a double helix in the case of a parallel G_4 due to the spatial remoteness, but instead destabilize the structure. Additionally, we investigated the effect of the described oligonucleotides on the activity of topoisomerase I, one of the key cell enzymes, with the main focus on the relationship between the stability of the formed quadruplexes and the inhibition degree of enzyme. The most active inhibitor with $IC_{50} = 0.08 \mu M$ was the oligonucleotide $d(CACTGG-CC-(GGGT)_4-TA-CCAGTG)$, whose flanking G_4 -motif sequences reduced the extreme stability of G-quadruplex formed by $d(GGGT)_4$.

Key words: G-quadruplexes, microsatellite repeats, stability and structure of G-quadruplexes, topoisomerase I inhibitors