

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.213.6

G4-КВАДРУПЛЕКСЫ И ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ

© 2013 г. Б. Л. Зыбайлов¹, М. D. Sherpa¹, Г. В. Глазко¹, К. D. Raney¹, В. И. Глазко^{2*}

¹University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS), Little Rock, 72205 AR, USA

²Российский государственный аграрный университет (МСХА) им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия

Поступила в редакцию 20.08.2012 г.

Принята к печати 18.09.2012 г.

Сравнительным анализом *in silico* ядерных и митохондриальных геномов позвоночных и дрожжей выявлено распределение нуклеотидных последовательностей, предрасположенных к формированию неканонической структуры ДНК – G-квадруплексов, тесно связанных с регуляцией экспрессии ряда генов и двухцепочечными разрывами ДНК. Полученные данные свидетельствуют о предпочтительной локализации потенциальных квадруплексов в некодирующих последовательностях ДНК, их эволюционной консервативности и наличии гомологии между ними в митохондриальных и ядерных геномах. Обсуждается взаимосвязь между квадруплексами, хеликазой Pif1 и геномной нестабильностью.

Ключевые слова: дестабилизация генома, двухцепочечные разрывы ДНК, квадруплексы, хеликазы.

G4-QUADRUPLEXES AND GENOME INSTABILITY, by B. L. Zybailov¹, M. D. Sherpa¹, K. D. Raney¹, G. V. Glazko¹, V. I. Glazko^{2*} (¹University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS), Little Rock, 72205 AR, USA; ²Timiryazev Russian State Agrarian University, Moscow, 127550 Russia; *e-mail: vglazko@yahoo.com). A comparative analysis *in silico* of distribution of nucleotide sequences that predispose to formation of non-canonical DNA structure of G-quadruplexes, closely related with gene expression regulation and double strand DNA breaks, within vertebrata and yeast nuclear and mitochondrial genomes was carried out. Data on preferable localization of potential quadruplexes within non-coding sequences, their evolutionary conservation, and existing homology between them in mitochondrial and nuclear genomes were obtained. A possible interrelation between quadruplexes, Pif1 helicase and genomic instability is discussed.

Keywords: genome destabilization, double strand DNA breaks, G quadruplexes, helicases.

DOI: 10.7868/S0026898413020183

Принято считать, что в основе онкологических заболеваний лежит “дарвиновская” селекция клеточных клонов в конкретных условиях клеточных “ниш”, которая определяет возможности клональной экспансии генетически и эпигенетически гетерогенных клеточных популяций [1]. Из этого следует, что выяснение механизмов дестабилизации генома – это ключевая проблема и в прогнозе развития онкологических заболеваний, и в разработке новых терапевтических средств [2]. Описано множество источников геномной дестабилизации, и большинство из них объединяет одно общее свойство – участие в геномной дестабилизации двухцепочечных разрывов ДНК (double strand breaks, DSBs) [1, 3].

В последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о тесной связи между повышенной частотой DSBs и присутствием неканонических структур ДНК. Экспериментально

показано, что геномная нестабильность напрямую связана с неканоническими структурами, такими как Z-DNA, H-DNA, R-loop, квадруплексы и триплексы [4–6]. Среди неканонических структур ДНК особенно активно исследуют квадруплексы, поскольку последовательности, потенциально способные к их формированию, выявлены в таких функционально важных структурных областях ДНК, как промоторы, теломеры, участки повышенной ломкости ДНК [7].

Квадруплексы (по-другому G4-структуры) представляют собой стабильные четырехцепочечные структуры, в которых гуанины образуют плоскость за счет поперечных водородных связей (рис. 1). Уже на ранних этапах изучения G-квадруплексов заметили их широкий структурный полиморфизм (рис. 1б). Предполагается, что интрамолекулярные квадруплексы (т.е. сложенные из одной цепи ДНК) наиболее распространены в биологических системах и могут принимать участие во всех процессах метаболизма ДНК и РНК,

* Эл. почта: vglazko@yahoo.com

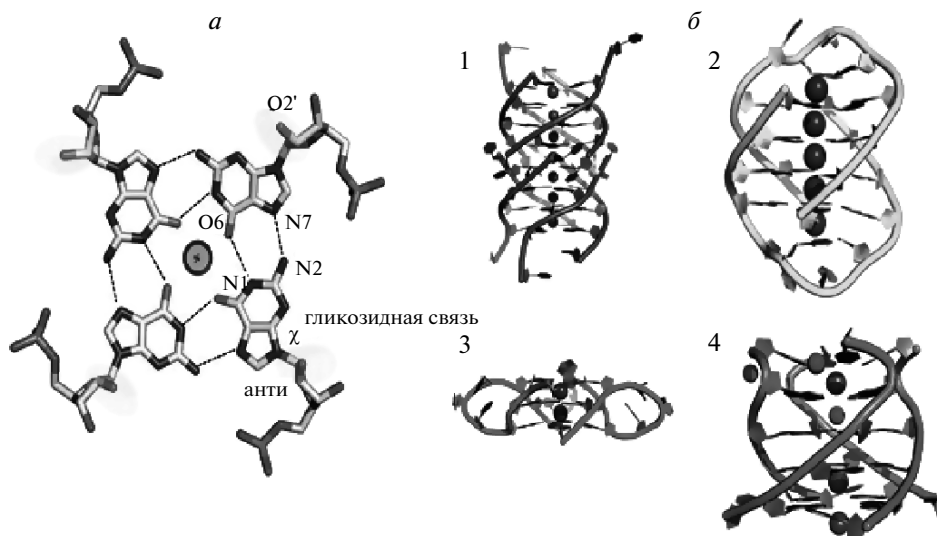


Рис. 1. Структура квадруплексов (из статьи [7] с любезного разрешения редакции; приведено с изменениями). *a* – Планарная гуаниновая тетрада с одновалентным катионом в центре. *б* – Структуры квадруплексов в условиях *in vitro*: тетрамолекулярная параллельная топология (1), бимолекулярная антипараллельная топология (2), параллельная бимолекулярная и интрамолекулярная топология (3), ‘широкий’ вариант тетрамолекулярной топологии (4) с ионами большого радиуса (калия, бария или стронция).

где в какой-то момент образуется одноцепочечный полинуклеотид: транскрипция, трансляция, рекомбинация и репарация (рис. 2б). Стабилизация квадруплексов определенными соединениями (например, замещенными порфиринами или теломестатином) позволяет влиять на экспрессию некоторых онкогенов, имеющих квадруплексы в регуляторных элементах, что используется в противоопухолевой терапии (рис. 2а).

Особый интерес к квадруплексам обусловлен еще и тем, что появляется все больше экспериментальных данных, указывающих на участие G4-мотивов в различных типах геномной нестабильности, выявляемых в популяциях опухолевых клеток. К наиболее распространенным дестабилизирующим геном факторам относят мутации в генах-супрессорах опухолей, хромосомные транслокации, формирование химерных белков за счет хромосомных транслокаций, изменчивость по копиям хромосом (нарушение работы анафаза-промотирующего комплекса). Известно, что хромосомные транслокации характерны для большинства онкологических заболеваний, и в ходе этих транслокаций квадруплексы непосредственно участвуют в образовании DSBs [8]. Выявлена тесная взаимосвязь между локализацией мотивов, способных к формированию квадруплексов, и участками повышенной ломкости в составе приблизительно 70% генов, участвующих в перестройках в лимфоидных опухолях [3, 9]. Установлено участие G4-структур в появлении ряда новых химерных генов, образующихся в результате межгенных обменов и часто используемых в качестве биомаркеров опухолевого процесса [10]. Показана важная роль G-квд-

руплекса, присутствующего в промоторе гена *c-myc* человека, в регуляции транскрипции этого гена [11]. Оказалось, что в промоторных областях ряда других онкогенов, таких как *BCL2*, *KRAS*, *VEGF*, *KIT* и *HIF*, также есть последовательности, способные образовывать квадруплексы, что предполагает их участие в регуляции экспрессии соответствующих онкогенов [11].

Получены данные о связи между стабилизацией квадруплексов и нарушениями при прохождении клеткой фазы митоза, что обусловлено дефектами работы анафаза-промотирующего комплекса [12]. Кроме того, используя синтетический аналог природного стабилизатора квадруплекса теломестатин, авторы показали, что стабилизация квадруплексов не только блокирует деление клеток, но и индуцирует их апоптоз [12]. По-видимому, одним из факторов влияния стабилизации квадруплекса на индукцию апоптоза может быть накопление полностью сплайсированного транскрипта гена *p53*, что обусловлено стабилизацией G4-структуры в интроне 3 этого гена, тем самым предупреждающей появление продукта его альтернативного сплайсинга (*p53*, дефектного по домену трансактивации) [13].

К настоящему времени распространенность нуклеотидных мотивов, потенциально способных образовывать квадруплексы в митохондриальном геноме, сравнительно подробно изучена только для *Saccharomyces cerevisiae*. Оказалось, что митохондриальная ДНК (мтДНК) *S. cerevisiae* содержит на порядок больше квадруплексов на

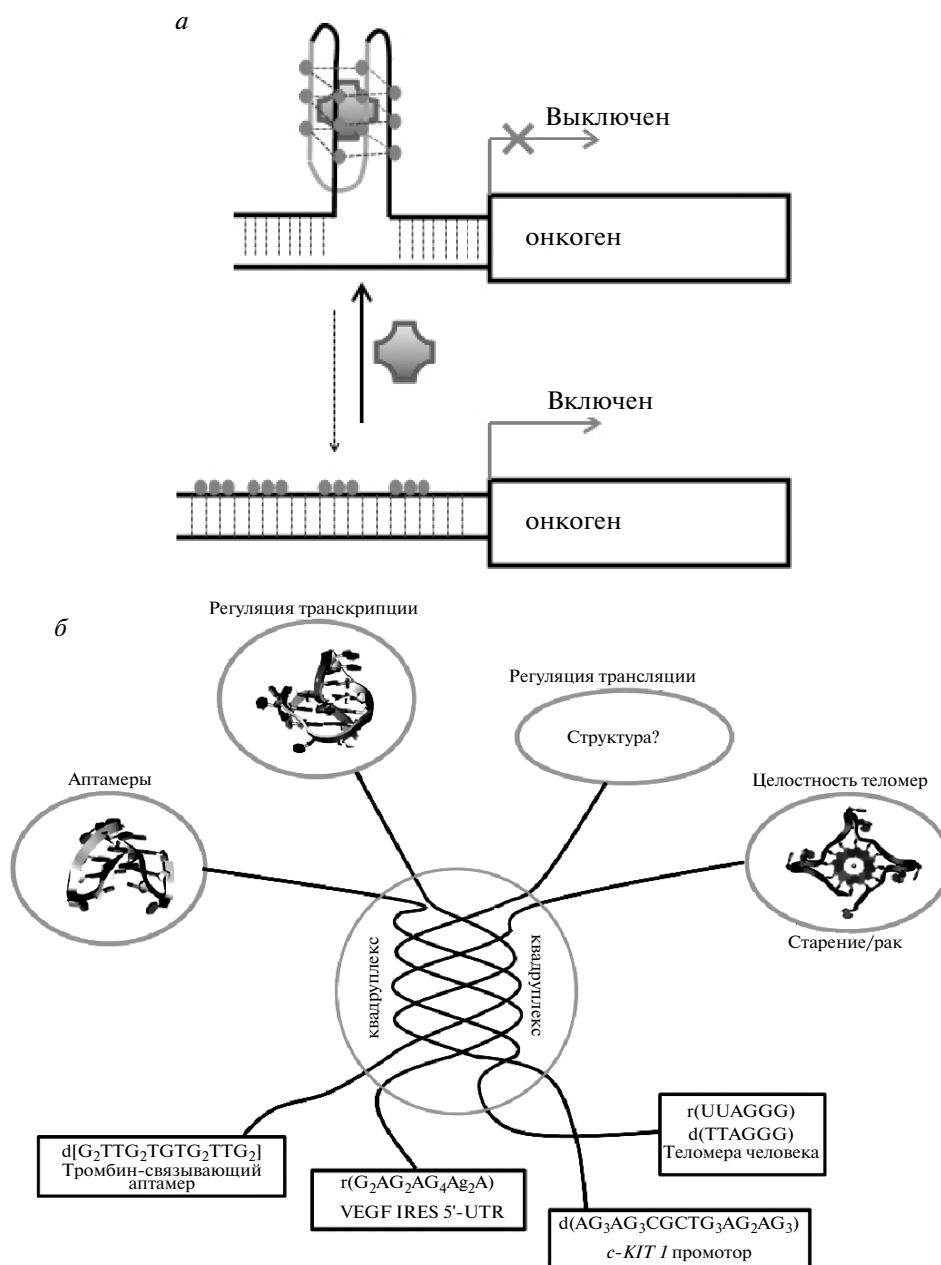


Рис. 2. Регуляторные эффекты квадруплексов. *a* – Одна из возможных функций квадруплексов в промоторах онкогенов. Малая молекула (показана на рисунке фигуркой серого цвета) – стабилизатор квадруплекса – может представлять собой, например, четырежды заряженный порфирин или теломестатин. *б* – Спектр предполагаемых функций квадруплексов (взято из [7] с разрешения редакции, приводится с изменениями). В эллипсах представлены варианты функций квадруплексов: аптамеры; регуляция транскрипции и, предположительно, регуляция трансляции; поддержание целостности теломер, что напрямую связано с механизмами старения и онкологических заболеваний. В прямоугольных блоках представлены варианты последовательностей, участвующих в указанных функциях (слева направо): аптамер, связывающий тромбин; последовательность РНК, влияющая на процессы трансляции; участок промотора, существенный для транскрипции гена *c-KIT 1*; элементарная единица теломерного повтора человека (r – РНК, d – ДНК).

одну тысячу пар нуклеотидов (0.373) чем ядерный геном (0.034–0.067) [14].

Распределение вероятных квадруплексов в митохондриальных геномах позвоночных до сих пор остается практически не исследованным. Это и стало целью нашей работы, в ходе которой выявлены

нуклеотидные последовательности, потенциально способные формировать квадруплексы в кодирующих и не кодирующих участках митохондриального генома разных видов позвоночных (человек, шимпанзе, горилла, курица, собака, утконос, мышь и крыса), а также в ядерных геномах

тех же видов. В целях сравнения такие же исследования проведены на ядерном и митохондриальном геномах *S. cerevisiae*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В ходе выполнения работы для определения местоположения последовательностей потенциальных квадруплексов по отношению к другим генетическим элементам мтДНК, а также их температур плавления, частот встречаемости в ядерном геноме, их длин и эволюционной консервативности, использованы данные и программы, имеющиеся в открытом доступе. Нуклеотидные последовательности взяты из базы данных митохондриальных геномов эукариот (MitoZoa), представленной в открытом доступе [15].

Потенциальные G4-структуры в каждой мтДНК идентифицировали с использованием программы Quadparser [16], которая также позволяет предсказать температуру плавления каждого квадруплекса, что важно для оценки его стабильности.

Для оценки консервативности G4-структур применяли алгоритмы BLAT и BLAST. BLAT позволяет выявить наличие сходных последовательностей в митохондриальном и ядерном геномах одного и того же вида. BLAST позволяет выполнить поиск и оценить степень сходства последовательностей потенциальных G4-структур, имеющихся не только в базе данных MitoZoa (т.е. полной последовательности мтДНК каждого члена базы MitoZoa), но и в пяти дополнительных базах, дочерних по отношению к MitoZoa [17].

Поиск последовательностей, потенциально способных к образованию квадруплексов, выполняли с учетом повторов в 2G, 3G и 4G с минимальной длиной петли в 1–7 или 1–20 нуклеотидов. Оценку потенциальных квадруплексов проводили с учетом их консервативности с использованием методов выравнивания, алгоритмов BLAT и BLAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Последовательности ДНК, потенциально способные образовывать квадруплексы, определяли как участки ДНК, содержащие не менее четырех трактов по два, три или больше остатков гуанина (G-тракты), которые разделены областью петли ограниченной длины: 1–7 или 1–20 н. Таким образом, последовательность, потенциально образующая квадруплексы, имеет следующую струк-

туру: $G_{2-5}N_{L1}G_{2-5}N_{L2}G_{2-5}N_{L3}G_{2-5}$, где обозначениями N_{L1-3} указаны петли, различные по длине и по нуклеотидному составу. Поиск таких последовательностей проводили в базах данных GenBank и MitoZoa, содержащих секвенированные последовательности ядерных и митохондриальных геномов [15, 17].

Каждый выявленный нами потенциальный квадруплекс оценивали индивидуально. В таблице 1 представлен пример организации коллекции потенциальных квадруплексов, собранных в базах данных секвенированных последовательностей ядерной и мтДНК человека. Это нуклеотидные последовательности самых стабильных, согласно температурам плавления (от 54 до 77°C), квадруплексов, найденных в мтДНК человека, и результаты BLAT-анализа по распределению потенциальных квадруплексов в ядерном и митохондриальном геномах. Такие же коллекции, с учетом тех же параметров, собраны для всех исследованных нами видов. Список видов и некоторые параметры потенциальных квадруплексов, выявленных нами в их ядерных и митохондриальных геномах, приведены в табл. 2.

Сопоставив распределения квадруплексов в мтДНК исследованных видов позвоночных, мы построили соответствующие карты локализации этих структур, что представлено на рис. 3. Полученные данные наглядно свидетельствуют об определенном эволюционном консерватизме позиционирования квадруплексов по отношению к кодирующим и некодирующим участкам мтДНК. Так выявлено, что мтДНК человека и других приматов, таких как шимпанзе и горилла, содержит 80–90 потенциальных последовательностей квадруплексов с G-трактами длиной больше или равной двум. Распределение предполагаемых квадруплексов в составе некоторых кодирующих последовательностей (например, *COX3* и *ND5*) оказалось похожим у всех исследованных видов (рис. 3). Плотность квадруплексов существенно выше в некодирующих районах по сравнению с кодирующими (табл. 1 и табл. 2). Относительно небольшое количество G4-структур обнаружено в генах тРНК и рРНК по сравнению с генами, кодирующими белки (рис. 3, табл. 1 и табл. 2).

Тяжелая цепь мтДНК всех исследованных организмов содержит существенно больше потенциальных квадруплексов, чем легкая (табл. 2). Потенциальные квадруплексы обнаружены в функционально важных структурных областях таких генов,

Рис. 3. Карты распределения потенциальных квадруплексов в линейных мтДНК разных видов позвоночных, построенные на основании результатов сравнительных исследований. Сверху вниз: человек (hu), шимпанзе (ch), горилла (gr), курица (ck), собака (dg), утконос (dp), мышь (m), крыса (r). Гены, кодирующие белок, обозначены красным (тяжелая цепь) и зеленым (легкая цепь), а кодирующие тРНК и рРНК – голубым. Позиции потенциальных квадруплексов указаны черными стрелками. Две прерывистые линии соединяют гены *COX3* и *ND5* в разных геномах (см. текст).

Таблица 1. Наиболее стабильные (с высоким значением T_m) квадруплексы в тяжелой цепи мтДНК человека, обнаруженные с помощью поисковых алгоритмов программ QUADPARSER и BLAT

№	A		B	C	D	E	F		G	H
	Старт	Ген	Ген	Стоп	T_m	σ	Квадруплекс-образующие последовательности в мтДНК человека	Длина	Хромосома	
1	494	некод.		512	77.3	4.1	GGGTGGGATGGCGGGGG	18	M	
2	534	некод.		574	75.42	8.41	GGGGGTCTCTTGGGGTTGGTTGGTTCGGGGTATGGGG	40	M,5 (79947960–79947997), 11 (10531833–10531870)	
3	3565	<i>ND1</i>		3613	70.52	4.74	GGAGCCCTAGGTTGAGGTTGACCCAGGGGGTGGGTATGGG- GAGGGGG	48	M	
4	7396	<i>Cox1</i>		7410	66.03	7.02	GCTAGGCTGGGGGG	14	M	
5	294	некод.		316	65.44	6.47	GGGGGAGGGGGGGTTGGTTGG	22	M	
6	13753	<i>ND5</i>		13771	59.23	9.58	GGAAGGGGATCGGGGG	18	M	
7	14518	<i>ND6</i>		14535	59.05	13.45	GGGGAGGTTATATGGG	17	M	
8	6256	некод.		6277	58.64	10.15	GGAGCCCGGAGCAGGAACAGG	21	M	
9	10266	<i>ND3</i>		10293	58.49	13.56	GGCTCATGTAGGGTAAAGGAGGG	27	M	
10	1483	<i>RNR1</i>		1499	58.40	7.44	GGAGGGTGACGGGGGG	16	M	
11	14327	<i>ND6</i>		14343	58.36	7.06	GGGTGTTGTTGTGG	16	M	
12	7954	<i>cox2</i>		7991	58.06	12.77	GGAGTCGCAGGTCGCCCTGTTCTAGGAATAATGGGGG	37	M,1 (568506–568542), 5 (99388838–99388874)	
13	10183	<i>ND3</i>		10214	57.71	8.65	GGAGAAAGGGACCGCGGGGGGATATAGGG	31	M	
14	792	<i>RNR1</i>		807	57.54	6.86	GGGGTGTGGCTAGG	15	M	
15	4136	<i>ND1</i>		4156	57.3	10.83	GGTCGTAGCGGAATCGGGGG	20	M,1 (564687–564706)	
16	3830	<i>ND1</i>		3852	56.72	11.71	GGCCAAGGGTCATGATGGCAGG	22	M,12 (41757464–41757485)	
17	13295	<i>ND5</i>		13315	56.28	11.84	GGATGCTAGTGTGGTTGG	20	M,5 (134261171–134261190)	
18	4373	некод.		4398	55.42	10.92	GGATGGGTGTGATAGTGGCACGG	25	M,1 (564924–564948)	
19	9267	<i>cox3</i>		9302	55.35	13.65	GGTAGGCCGGAGGTCATTAGGAGGGCTGACAGGGG	35	M,1 (569817–569851)	
20	13118	<i>ND5</i>		13132	55.25	8.36	GGGGTGGAAAGCGG	14	M	
21	13970	<i>ND5</i>		14004	55.16	10.96	GGTTAGGTCTAGGAGGAGTAGGGCCAGGTTTGG	34	M	
22	14114	<i>ND5</i>		14137	55.15	12.31	GGAGTAGGGTTAGGATGATGGG	23	M,5 (134260349–134260371)	
23	15515	<i>cytb</i>		15545	54.97	9.67	GGGAGGGGTGTTAAGGGGTTGGCTAGGG	30	M	
24	10998	некод.		11022	54.69	11.42	GGTTCACTGGATAAGTGGCGTTGG	24	M	
25	6419	<i>cox1</i>		6450	54.50	7.74	GGGGCGTTTG G T A T T G G G T T A T G G C A G G G G G	31	M,1 (566970–567000), 14 (32953460–32953490)	
26	13022	<i>ND5</i>		13044	54.43	7.21	GGCTGAGGGGAGTCCAGGGGTTGG	22	M,5 (134261442–134261462), 5 (99383782–99383802)	
27	12541	<i>ND5</i>		12568	54.31	9.77	GGGAGAGCTGGGTTGTTGGGTTGTGG	27	M	
28	8384	<i>Atp8</i>		8417	54.18	14.14	GGAGTATGGGGGTAATTATGGTGGGCCATACGG	33	M	
29	10543	<i>N04L</i>		10566	54.08	19	GGCATAGTAGGGAGGATATGAGG	23	M	

Примечание. A – начальная координата квадруплекса на мтДНК; B – ген, в котором найден квадруплекс (некод. = некодирующий участок); C – конечная координата квадруплекса на мтДНК; D – температура плавления, °C; E – стандартное отклонение T_m , °C; F – последовательность квадруплекса; G – длина квадруплекса; H – хромосома, где найден квадруплекс с помощью BLAT; M – мтДНК; жирным шрифтом выделены номера ядерных хромосом, где квадруплекс на 100% идентичен митохондриальному, наклонным шрифтом выделены хромосомные позиции, где квадруплекс отличается от митохондриального одной-двумя заменами в петлях квадруплекса. Позиции квадруплексов в ядерных хромосомах указаны в скобках. Координаты соответствуют геному человека редакции за февраль 2009, GRCh37/hg19.

Таблица 2. Распределение потенциальных G-квадруплексов в мтДНК исследованных видов

Виды	Общая длина, п.н.	Количество G4 (2GC)*		Содержание GC, %	Доля G4 в кодирующих и некодирующих последовательностях				Плотность, на 1 т.п.н.	
		тяжелая цепь	легкая цепь		кодирующие	рРНК	тРНК	некодирующие	тяжелая цепь	легкая цепь
<i>Homo sapiens</i>	16569	79	1	44.404	0.142	0.067	0.013	0.246	4.768	0.060
<i>Pan troglodytes</i>	16554	78	1	43.70	0.122	0.065	0	0.220	4.712	0.060
<i>Gorilla gorilla</i>	16412	83	2	43.80	0.143	0.055	0.010	0.343	5.057	0.122
<i>Pongo albeli</i>	16499	91	3	45.94	0.155	0.064	0	0.454	5.520	0.182
<i>Canis lupis familiaris</i>	16727	33	1	39.65	0.056	0.014	0	0.057	1.973	0.060
<i>Platypus</i>	17019	26	2	37.12	0.042	0	0.023	0.022	1,528	0.118
<i>Gallus gallus</i>	16775	94	2	46.00	0.193	0.069	0.035	0.217	5.127	0.119
<i>Rattus norvegicus</i>	16313	45	1	38.58	0.071	0.022	0	0.161	2.758	0.061
<i>Mus musculus</i>	16299	29	0	36.75	0.037	0.014	0	0.157	1.770	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85779	65	68	17.11	0.007	0	0	0.053	0.758	0.792

* – 2GC обозначает две комплементарные пары GC на обеих цепях, которые на определенном расстоянии способны создавать квадруплексы с другими двумя парами оснований GC.

как субъединицы NADH-дегидрогеназы, цитохром с оксидаза (COX), цитохром b (CYT-b). В мтДНК просматривается тенденция к смещению частоты встречаемости мотивов квадруплекса в область белок- и рРНК-кодирующих последовательностей, но не в тРНК-кодирующие районы (табл. 1 и табл. 2).

В результате сравнительного анализа ядерных и митохондриальных геномов каждого вида выявлен ряд последовательностей, потенциально способных к формированию квадруплексов, которые присутствуют в обоих геномах (табл. 1).

Некоторые последовательности, несущие потенциальные квадруплексы в мтДНК, дублированы в ядерных геномах тех же видов (см. табл. 1). Можно ожидать, что такие дубликации сохраняются неслучайно, поскольку наблюдаются у разных видов и, по-видимому, свидетельствуют об их определенной функциональной значимости. Кроме того, это может быть обусловлено горизонтальным переносом фрагментов мтДНК в ядерный геном. Такой перенос описан во многих работах и получил название NUMT – nuclear mitochondrial DNA. Более того, у млекопитающих выявлены вставки NUMT в онкогены в постоянных клеточных линиях опухолей и увеличение количества NUMT в опухолевых клетках по сравнению с неопухолевыми [18]. Судя по сохранности квадруплексов, можно ожидать их участие в переносе генетического материала из митохондриального генома в ядерный.

Результаты проведенного нами сравнительного анализа распределения вероятных квадруплексов по митохондриальному и ядерному геномам позвоночных и *S. cerevisiae* (табл. 2) свидетельствуют о том, что во всех организмах плотность распределения G4-структур выше в некодирующих участках ДНК, чем на участках, кодирующих белки, рРНК и тРНК. И это хорошо согласуется с данными других авторов [14, 19] по анализу распределения вероятных квадруплексных мотивов в ядерной и мтДНК *S. cerevisiae*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работах [14, 19] анализ распределения G4-структур по ядерному геному показал надежную ассоциацию квадруплексов с сайтами частых DSBs в митотических и мейотических клетках. Предполагается, что существенное перекрытие “горячих” сайтов DSBs в митозе и мейозе обусловлено присутствием G4-структур с общей функцией в двух типах клеточного деления.

Присутствие квадруплексов в сайтах DSBs позволяет предположить наличие двух, не исключаящих друг друга, функций, благодаря которым квадруплексы способствуют образованию DSBs.

Во-первых, квадруплексы могут непосредственно участвовать в формировании DSBs. Один из необходимых факторов для успешного прохождения репарации ДНК в области DSBs – это наличие одонитового фрагмента ДНК на 3'-конце. Формирование G4-структуры в этих областях ДНК может способствовать появлению повреждений ДНК и

влиять на последующие события. Действительно, некоторые белки *S. cerevisiae*, задействованные в репарации и рекомбинации ДНК, имеют активность, изменяющую G4-структуры [14].

Во-вторых, формирование G4-структур во время репликации ДНК может замедлять или даже останавливать продвижение репликативной вилки, увеличивая вероятность DSBs. Известно, что от дрожжей до человека теломерная ДНК, обогащенная квадруплексами, препятствует движению репликативной вилки в ходе стандартного полуконсервативного синтеза ДНК. К тому же, мутации в ДНК-хеликазах, которые раскручивают квадруплексы, приводят к хромосомным делециям в местах локализации квадруплексов [14].

Факты предпочтительной локализации квадруплексов в некодирующих последовательностях митохондрий дрожжей [14, 19], а также позвоночных (рис. 3, табл. 1 и табл. 2), заселение участков мтДНК ядерных геномов у разных видов, ассоциация G4-структур с DSBs и “горячими” сайтами рекомбинации в митозе и мейозе позволяют полагать, что последовательности квадруплексов вовлекаются во внутривитальные рекомбинации в геноме самой мтДНК.

На относительно хорошо изученной мтДНК *S. cerevisiae* показано, что Pif1-хеликаза проявляет высокое сродство к участкам формирования квадруплексов. Pif1-хеликаза связывает и разворачивает G-квадруплексы *in vitro*, участвует в реализуемых через квадруплексы событиях рекомбинации и репликации [19]. Показано, что Pif1-хеликаза *S. cerevisiae* участвует в репликации ДНК, кодирующей теломеры, рРНК и мтДНК, – три ДНК-последовательности с особо высокими плотностями G4-структур. Гипотеза о роли Pif1-хеликазы в обеспечении геномной стабильности через G4-структуры недавно подкреплена данными, свидетельствующими о том, что эти хеликазы предпочтительно ассоциированы с квадруплексами и “горячими” сайтами DSBs на митотических хромосомах *in vivo* [14, 19].

Pif1-хеликаза *S. cerevisiae* принадлежит к суперсемейству SF-хеликаз, имеющих большое сходство с супер-семейством RecD. Pif1-хеликаза защищает ДНК митохондрии от окислительного стресса, по-видимому, путем замедления продвижения репликативной вилки и увеличения времени или изменения структуры ДНК, что необходимо для более эффективной репарации. Консервативность Pif1 у дрожжей и человека обнаружена на уровне не только структуры фермента, но и его антиоксидантной функции. Предполагается, что фермент играет важную роль в предупреждении накопления мутаций в мтДНК, ассоциированных как со старением, так и с последствиями окислительных процессов. Имеющиеся на сегодня данные свидетельствуют о тесной связи между ре-

пликацией и целостностью мтДНК, что обеспечивается взаимодействиями между хеликазами и ДНК-полимеразами [20].

У человека выявлено около 25618 “горячих” сайтов мейотических рекомбинаций, которые существенно обогащены потенциальными участками формирования ДНК-квадруплексов. Показано, что раскручивающие их хеликазы выполняют множественные функции в поддержании геномной стабильности не только в теломерах, но и в участках ДНК-разрывов при мейотических рекомбинациях. Совокупность данных свидетельствует о том, что некоторые из хеликаз имеют опухоль-супрессорную функцию [21].

К суперсемейству SF1, кроме Pif1, принадлежат хеликазы, участвующие в типичной для некоторых вирусов репликации по принципу “катящегося кольца”. Выявлена и описана уникальная группа ДНК-транспозонов, реплицирующихся по такому же принципу и названная хелитронами (helitron). Такие генетические элементы обнаружены во многих эукариотах, включая грибы, растения, насекомых и позвоночных. Особенность автономных хелитронов состоит в том, что для репликации ДНК они используют собственный белок, Pif1-подобную ДНК-хеликазу, которая одинакова для всех хелитронов. Этот белок имеет высокую степень гомологии с бактериальным белком RC (rolling-circle), известным своим участием в горизонтальном переносе генов устойчивости к антибиотикам между разными бактериями. Как и их бактериальные “родственники”, некоторые хелитроны функционируют как “машины перетасовки экзонов”. У кукурузы, например, выявлено около 20000 фрагментов разных генов, которые были “перетасованы” с участием хелитрона [22, 23]. Представлены данные, свидетельствующие о том, что хелитроны способны к рекомбинации и встраиванию в вирусы насекомых, которые, по-видимому, могут быть посредниками в их горизонтальном переносе. В копиях ДНК хелитрона в геноме *A. thaliana* выявлены последовательности, кодирующие два белка с высокой гомологией к Pif1-хеликазе дрожжей [24].

Таким образом, можно ожидать, что квадруплексы, биологические функции которых тесно связаны с функцией хеликазы Pif1, могут принимать участие в формировании двухцепочечных разрывов ДНК, вносить существенный вклад в геномную нестабильность, а также в горизонтальный перенос генетического материала, в том числе и в расселение фрагментов мтДНК в ядерном геноме. Кроме того, выявленная нами повышенная плотность квадруплексов в мтДНК многих видов, говорит о возможной защитной функции квадруплексов. Действительно, мтДНК находится под большим (по сравнению с ядерным геномом) повреждающим давле-

нием из-за свободных радикалов, постоянно генерируемых митохондриальной окислительно-восстановительной цепью.

На основании полученных нами данных можно сформулировать следующие гипотетические положения, которые, безусловно, требуют дальнейшего экспериментального подтверждения: 1) квадруплексы представляют собой сигналы повреждения мтДНК ввиду замедления движения репликативной вилки в процессе ДНК-репарации; 2) хеликаза Pif1 непосредственно участвует в процессировании квадруплекс-сигнала.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Арканзас INBRE: "The Arkansas INBRE is Supported by a grant from the National Institutes of Health and the National Center for Research Resources (P20 RR16460)".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Greaves M., Maley C.C. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature*. **481**, 306–313.
- Lord C.J., Ashworth A. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. **481**, 287–294.
- Kadapadi V.K., Nambiar M., Raghavan S.C. 2012. Potential G-quadruplex formation at breakpoint regions of chromosomal translocations in cancer may explain their fragility. *Genomics*. **100**, 72–80.
- Raghavan S.C., Lieber M.R. 2007. DNA structure and human diseases. *Front. Biosci.* **12**, 4402–4408.
- Raghavan S.C., Lieber M.R. 2006. DNA structures at chromosomal translocation sites. *BioEssays*. **28**, 480–494.
- Wang G., Vasquez K.M. 2006. Non-B DNA structure-induced genetic instability. *Mutat. Res.* **598**, 103–119.
- Collie G.W., Parkinson G.N. 2011. The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5867–5892.
- Nambiar M., Raghavan S.C. 2011. How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucl. Acids Res.* **39**, 5813–5825.
- Nambiar M., Goldsmith G., Moorthy B.T., Lieber M.R., Joshi M.V., Choudhary B., Hosur R.V., Raghavan S.C. 2011. Formation of a G-quadruplex at the BCL2 major breakpoint region of the t(14;18) translocation in follicular lymphoma. *Nucl. Acids Res.* **39**, 936–948.
- Ju Y.S., Lee W.-C., Shin J.-Y., Lee S., Bleazard T., et al. 2012. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res.* **22**, 436–445.
- Fekete A., Kenesi E., Hunyadi-Gulyas E., Durgo H., Berko B., et al. 2012. The guanine-quadruplex structure in the human *c-myc* gene's promoter is converted into B-DNA form by the human poly(ADP-ribose)polymerase-1. *PLoS ONE*. **7**, (8), e42690.
- Tsai Y.-C., Qi H., Lin C.-P., Lin R.-K., Kerrigan J.E., Rzuczek S.G., LaVoie E.J., Rice J.E., Pilch D.S., Lyu Y.L., Liu L.F. 2009. A G-quadruplex stabilizer induces M-phase cell cycle arrest. *J. Biol. Chemistry*. **284**, 22535–22543.
- Marcel V., Tran P.L.T., Sagne C., Martel-Planche G., Vaslin L., Teulade-Fichou M.-P., Hall J., Mergny J.-L., Hainaut P., van Dyck E. 2011. G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis*. **32**, 271–278.
- Capra J.A., Paeschke K., Singh M., Zakian V.A. 2010. G-Quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Comput. Biol.* **6**, 1–13.
- D'Onorio de Meo P., D'Antonio M., Griggio F., Lupi R., Borsani M., Pavesi G., Castrignano T., Pesole G., Gissi C. 2012. MitoZoa 2.0: a database resource and search tools for comparative and evolutionary analyses of mitochondrial genomes in Metazoa. *Nucl. Acids Res.* (Database issue). **40**(D1), D1168–D1172.
- Wong H.M., Stegle O., Rodgers S., Huppert J.L. 2010. A toolbox for predicting G-quadruplex formation and stability. *J. Nucleic Acids*. **2010**, 6 P; doi:10.4061/2010/564946.
- Du Z., Zhao Y., Li Ning. 2009. Genome-side colonization of gene regulatory elements by G4 DNA motifs. *Nucl. Acids Res.* **37**, 6784–6798.
- Chatre L., Ricchetti M. 2011. Nuclear mitochondrial DNA activates replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*. **6**, (3), e17235.
- Paeschke K., Capra J.A., Zakian V.A. 2011. DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase. *Cell*. **145**, 678–691.
- de Souza-Pinto N. C., Aamann M.D., Kulikowicz T., Stevensner T.V., Bohr V.A. 2010. Mitochondrial helicases and mitochondrial genome maintenance. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 503–510.
- Uringa E.-J., Youds J.L., Lisaingo K., Lansdorp P.M., Boulton S.J. 2011. RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. *Nucl. Acids Res.* **39**, 1647–1655.
- Thomas J., Schaack S., Pritham E.J. 2010. Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals. *Genome Biol. Evol.* **2**, 656–664.
- Yang L., Bennetzen J.L. 2009. Structure-based discovery and description of plant and animal Helitrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 12832–12837.
- Kapitonov V.V., Jurka J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 8714–8719.

