

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.21:577.29

© Коллектив авторов

КОНФОРМАЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ G-БОГАТЫХ ФРАГМЕНТОВ ALU-ПОВТОРОВ ДНК. II. ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР В ГЕНОМНЫХ ПЕРЕСТРОЙКАХ

*А.М. Варижук, А.В. Секридова, М.В. Танкевич, В.С. Подгорский, И.П. Смирнов, Г.Е. Позмогова**

ФННКЦ физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства,
Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а; тел.: +74992464696; факс: +74992464409;
эл. почта: pozmge@niifhm.ru

Показана способность трёх консервативных G-богатых участков Alu-повторов (PQS2, PQS3 и PQS4) формировать *in vitro* стабильные внутри и межмолекулярные G-квадруплексы (GQ). Спектральными методами определены их структура и топология. Проведено исследование самоассоциации G-богатых фрагментов Alu. С использованием FRET-эффекта впервые показано образование димерных GQ из дистально расположенных сайтов (PQS2)₂, (PQS3)₂ и PQS2-PQS3 в составе протяжённой однонитевой ДНК. Методами DOSY ЯМР, АСМ, дифференциального КД-анализа показано, что олигомер PQS4 (параллельный GQ) образует стопки, стабилизированные стекинг-взаимодействиями внешних G-тетрад. Сравнительный анализ свойств различных GQ позволил высказать предположение об универсальности механизмов межмолекулярных GQ-зависимых геномных перестроек двух типов: образование димерных GQ из фрагментов разных молекул и формирование GQ-GQ-стопок взаимодействием уже сложившихся в составе разных ДНК параллельных GQ. Ассоциация G-богатых мотивов Alu с локусами, чувствительными к разрывам и перестройкам, может быть обусловлена не только особенностями структуры G-богатых фрагментов Alu, но, в первую очередь, их высокой представленностью в геноме.

Ключевые слова: G-квадруплекс ДНК, Alu-повторы, динамика вторичных структур ДНК

DOI 10.18097/PBMC20166206630

ВВЕДЕНИЕ

Межмолекулярные взаимодействия G-богатых фрагментов полинуклеотидов, их участие в генной регуляции, транслокации и рекомбинации активно обсуждаются в публикациях последних лет. О фундаментальном значении и универсальности таких процессов свидетельствуют многие исследования. Например, показана регуляторная функция образования ДНК-РНК GQ [1], GQ-зависимое выравнивание длины теломера и взаимодействие сайтов рекомбинации [2]. Недавно была описана роль GQ-структур в развитии антигенной изменчивости широкого круга патогенов (гонококки, менингококки, спирохеты) [3, 4]; обобщены данные о роли GQ-сайтов в биогенезе вирусов [5]. В основе предполагаемых механизмов лежат свойства G-богатых участков полинуклеотидов, однако закономерности их конформационных превращений и формирование межмолекулярных комплексов изучены недостаточно. Alu-повторы (Alu) генома человека, как известно, играют важную роль в процессах транслокации, рекомбинации и развитии заболеваний [6]. В настоящей работе изучены консервативные PQS (Potential GQ Site) Alu, их структура и свойства для оценки возможной роли неканонических структур в механизмах геномных перестроек.

В первой части работы [7] проанализированы Alu-последовательности интрона проонкогена bcl2 (Alu_{bcl2}) и консенсусного Alu-повтора (Alu_{cons}) [8, 9]; определены PQS фрагменты (рис. 1), а также

показано, что в геноме человека они ассоциированы преимущественно с активными Alu-семействами. В экспериментах на культурах клеток выявлены генно-регуляторные свойства рекомбинантных Alu. Впервые достоверно подтверждено формирование не-B-структур в составе Alu-ампликонов. В настоящей работе рассмотрена способность PQS Alu формировать *in vitro* внутри- и межмолекулярные GQ, их термостабильность и топология. Проведён анализ самоассоциации модельных олигомеров и возможности реализации процессов GQ-рекомбинаций с участием PQS Alu.

МЕТОДИКА

Синтез олигонуклеотидов, их очистку и анализ проводили по методу [10].

УФ- и КД-спектроскопия

Спектры кругового дихроизма (КД) и профили термической диссоциации (кривые плавления) GQ регистрировали на спектрофотометре Chirascan ("Applied Photophysics", Великобритания). Олигонуклеотиды растворяли в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 100 мМ KCl. Непосредственно перед экспериментом нагревали образцы до 90°C, выдерживали в течение 5 мин и охлаждали на льду ("быстрый отжиг" для обеспечения внутримолекулярного фолдинга). При исследовании концентрационной зависимости температуры плавления PQS2.1 проводили "медленный отжиг" (нагрев до 90°C и постепенное охлаждение

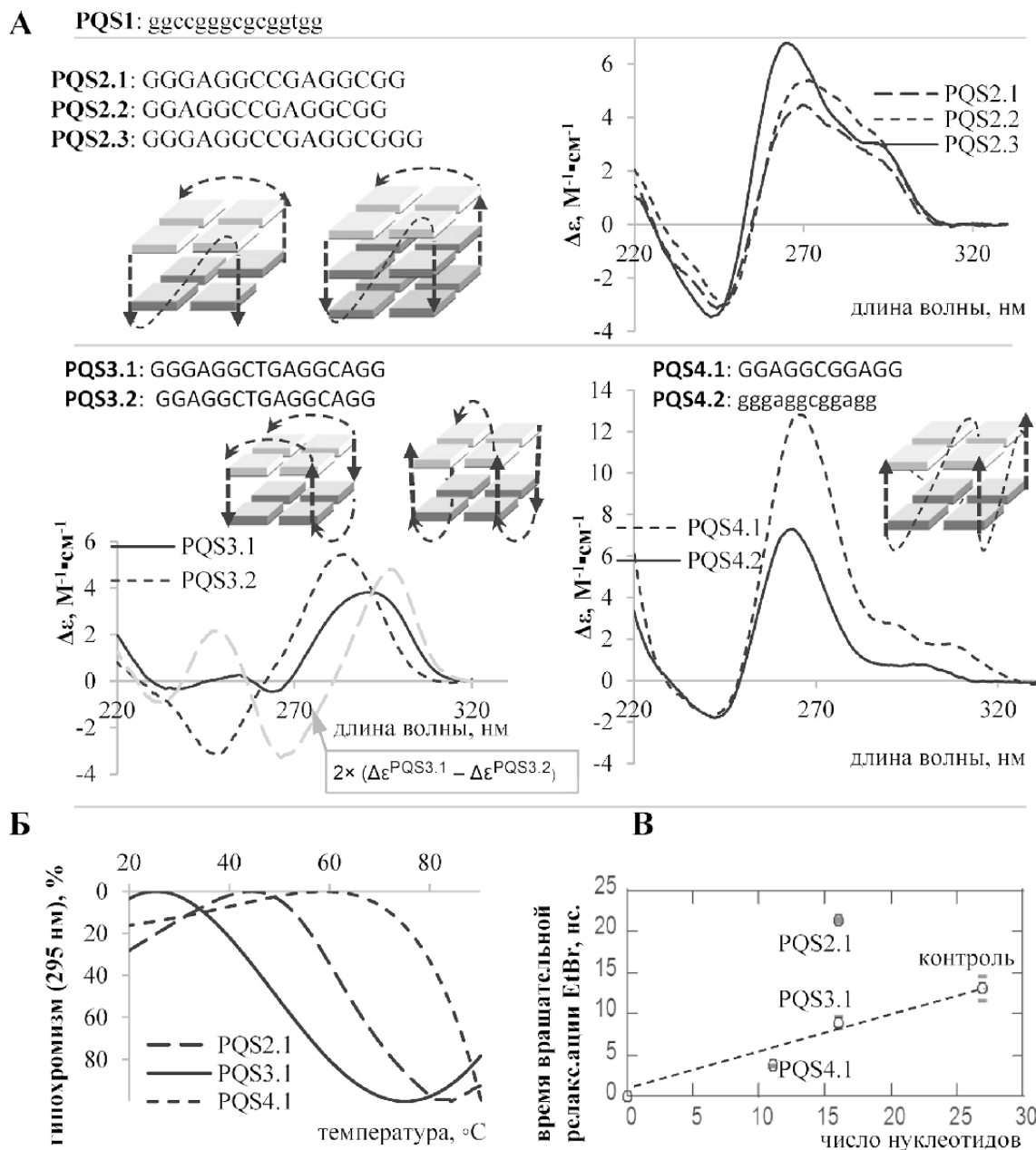


Рисунок 1. Анализ вторичной структуры Alu PQS оптическими методами. А - КД-спектры и схематическое представление предполагаемых структур GQ. Прописными буквами обозначены PQS Alu cons, отсутствующие в Alu_{bcl2} . PQS1 не образует GQ по данным КД и УФ-плавления. Молярная эллиптичность приведена в расчёте на 1 нуклеотид. Условия: 20 мМ Na-фосфатный буфер, 100 мМ KCl. Концентрация олигонуклеотидов: 5 мкМ, быстрый отжиг непосредственно перед экспериментом. Б - Кривые УФ-плавления. В: Анализ времён вращательной релаксации EtBr в комплексе с олигонуклеотидами (рассчитывали на основании величин поляризации и времени жизни флуоресценции EtBr). Точки на графике соответствуют средней величине из трёх измерений; стандартное отклонение не превышало 10%.

до комнатной температуры). Времена вращательной релаксации EtBr в комплексе с олигонуклеотидами определяли по известной методике [11, 12].

FRET

Растворы олигонуклеотидов (1 мкМ), несущих флуоресцентную метку (FAM) на 5'-конце и гаситель (BHQ1) на 3'-конце, в 20 мМ Трис-HCl-буфере (pH 7,8), содержащем 100 мМ KCl, подвергали "быстрому отжигу" как описано выше. Регистрировали спектры

испускания флуоресценции и кривые плавления по флуоресценции в 520 нм на спектрофотометре Chirascan ("Applied Photophysics") при возбуждении на длине волны 490 нм.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Подготовка образцов олигонуклеотидов состояла в "медленном отжиге" 0,2-0,1 мМ растворов олигонуклеотидов в буфере (10-200 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5). Аликвоту раствора

разбавляли буфером (10 mM KCl, 0,5 mM Трис-НСl, pH 7,5) в 100-2000 раз, наносили на поверхность модифицированного графита. Сканирование проводили с помощью АСМ-микроскопа (“NT-MDT”, Россия) по методу [13].

Рельеф образцов измеряли в полуконтактном резонансном режиме (Интегра Прима, “NT-MDT”) с помощью программы управления NOVA 1.1. Применяли сверхострые кремниевые кантилеверы высокого разрешения с резонансной частотой в диапазоне 190–325 кГц, радиусом кривизны острия < 2 нм (“Нанотюнинг”, Россия). Амплитуда свободных колебаний кантилевера в воздухе лежала в пределах 1-10 нм, автоматически поддерживаемую амплитуду в подведённом к поверхности состоянии (параметр SetPoint) устанавливали на уровне 60-70% от неё. Обработку сигнала и формирование изображений проводили с помощью программного обеспечения NOVA 1.1 (“NT-MDT”), высоты визуализированных объектов измеряли с помощью NOVA Image Analysis 2.0.

ЯМР-спектроскопия

Для исследования методом спектроскопии ЯМР олигонуклеотиды растворяли в Трис-НСl-буфере (20-40 mM KCl, Трис-НСl, pH 7,5). Спектры были получены на спектрометре ЯМР Bruker Avance III 500 MHz, оборудованном трёхканальным инверсным криогенным датчиком Prodigy TCI. Для каждого образца олигонуклеотида регистрировали одномерные протонные спектры с подавлением воды (WATERGATE с пятью парами биномиальных градиентных импульсов) с релаксационной задержкой 3 с, градиентной задержкой 200 мкс и длительностью биномиальных импульсов для подавления воды 125 мкс в 256-1024 прохождения при температурах от 290 К до 330 К с шагом в 10 К. Также для олигонуклеотидов и стандартных калибровочных образцов регистрировали двумерные диффузионные спектры DOSY с подавлением воды с помощью WATERGATE (использована импульсная последовательность с биполярными градиентными импульсами STEBPG) с релаксационной задержкой 3 с и приведёнными выше параметрами WATERGATE и диффузионной задержкой (Δ) 100 мс с изменением мощности градиентного импульса с 5 до 95% в 16 шагов за 64 прохождения. Все образцы анализировали в ампулах диаметром 5 мм с использованием 600 мкл раствора образца и добавлением 50 мкл D₂O для стабилизации сигнала.

Электрофоретический анализ в ПААГ

Для изучения самоассоциации олигонуклеотидов проводили аналитический электрофорез в неденатурирующих условиях. 200 мкл растворов олигомеров DPQS4.1 (10 пмоль/мкл) в буфере (20 mM KCl, 0,1 mM Трис-НСl, pH 7,5) после “быстрого отжига” концентрировали в вакууме в 10 раз (2 ч при 20°C). Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в стандартном 10% геле (без добавления мочевины) в течение 60 мин при +4°C и 250 В и окрашивали SYBR Gold (“Invitrogen”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование вторичной структуры *Alu* PQS

В результате анализа последовательностей Alu_{bcl2} и Alu_{cons} были определены частично перекрывающиеся PQS. Вторичная структура каждого PQS-олигонуклеотида была охарактеризована оптическими методами (рис. 1).

Олигомер PQS1, присутствующий только в Alu_{cons} , не формирует GQ. В профилях его тепловой денатурации отсутствуют характерные для GQ переходы при 295 нм. Последовательность PQS1 совпадает с последовательностью В-бокса [9, 14] в составе Alu , который является внутренним промотором РНК-полимеразы III. Следует отметить, что этот результат подтверждает предположение о том, что формирование неканонической структуры в локусе связывания полимераз может затруднить взаимодействие ДНК с ферментом и поэтому маловероятно.

По данным КД-спектроскопии (рис. 1А) и УФ-плавления (рис. 1Б) олигонуклеотиды PQS2-4 формируют термостабильные GQ ($T_{пл.} = 50-85^\circ\text{C}$) в физиологических условиях.

Соотношение амплитуд КД PQS2.1-PQS2.3 при 265 и 295 нм свидетельствует о гибридной топологии GQ (предполагается, что в случае PQS2.3 два G-квартета в коре GQ имеют одинаковую полярность, а третий – противоположную; рис. 1А).

Сравнение времен вращательной релаксации флуоресцирующего интеркалятора в комплексе с Alu PQS-олигонуклеотидами (данная величина в первом приближении пропорциональна гидродинамическому объёму комплекса) и контрольной мономолекулярной структурой (27-членная шпилька) позволяет заключить, что PQS2.1 представляет собой бимолекулярный GQ, тогда как PQS3.1 и PQS4.1 – внутримолекулярные структуры (рис. 1В).

О бимолекулярности GQ PQS2.1 свидетельствует и концентрационная зависимость термостабильности структуры, приведённая на рисунке 2.

КД-спектр PQS3.1 близок к классическому спектру антипараллельного GQ (положительные максимумы около 245 и 290 нм, отрицательный максимум при 265 нм), однако основной положительный максимум несколько сдвинут в коротковолновую область (290 нм вместо ожидаемых 295 нм). Этот эффект, по-видимому, связан с тем, что в растворе PQS3.1 представлен равновесной смесью конформеров: в виде расплавленной нити или неканонической шпильки и параллельного двухквартетного GQ. Как показано на рисунке 1А, наблюдаемый спектр PQS3.1 может быть результатом суперпозиции классического спектра антипараллельного GQ и спектра PQS3.2 – фрагмента PQS3.1, по данным УФ-плавления не образующего GQ.

КД-спектры PQS4.1 и PQS4.2 имеют вид, типичный для параллельного GQ (положительный максимум при 265 нм, отрицательный – при 245 нм, рис. 1В). Эти олигонуклеотиды являются одним из

КОНФОРМАЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДНК Alu -ПОВТОРОВ

первых примеров двухквартетных параллельных GQ с высокой термической стабильностью ($T_{пл.} > 80^{\circ}C$) и представляют собой новый перспективный объект для изучения.

На рисунке 3А приведены фрагменты одномерных протонных спектров ЯМР олигонуклеотидов PQS4.1 и PQS3.1. Восемь сигналов протонов иминовых групп (11-12 ppm), участвующих в образовании водородных связей, соответствуют двум G-квартетам, что согласуется со структурами, изображенными на рисунке 1. В случае PQS2.1 точно установить число протонов, участвующих в образовании Хугстиновских водородных связей, не удалось из-за уширения сигналов в иминовой области, что может означать

полиморфизм структуры PQS2.1 и/или образование межмолекулярных GQ.

Таким образом, анализ G-богатых фрагментов Alu на уровне олигонуклеотидных моделей позволил выявить три локуса, способных в физиологических условиях участвовать в формировании высокостабильных GQ различной топологии.

Для понимания механизмов GQ-зависимых геномных перестроек необходимо исследовать возможность образования и природу межмолекулярных GQ-комплексов полинуклеотидов, а также оценить способность PQS_{Alu} к формированию таких комплексов.

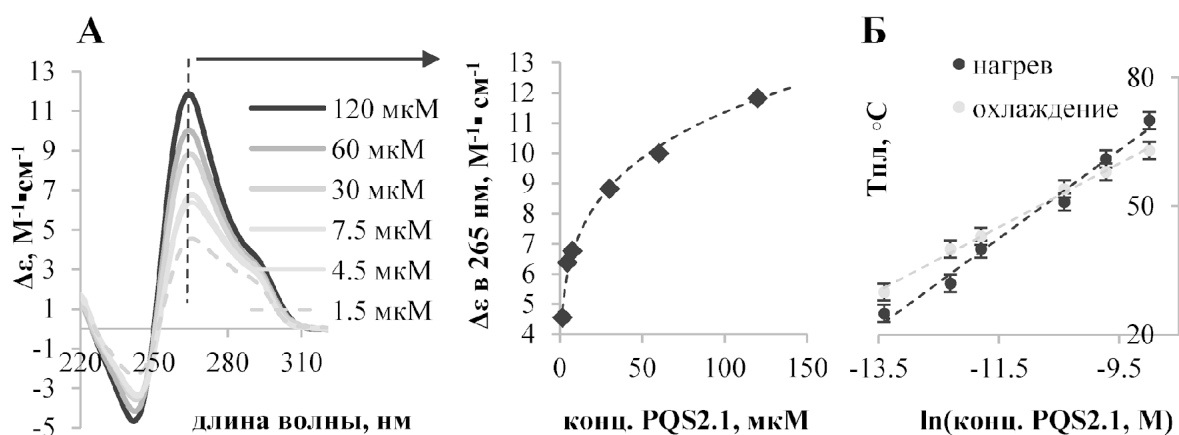


Рисунок 2. Исследование самоассоциации PQS2.1. оптическими методами. А - Концентрационная зависимость молярной эллиптичности PQS2.1. Условия: 20 мМ Трис-НСl, 100 мМ КCl; медленный отжиг перед экспериментом (при быстром отжиге вид кривой аналогичен). Б - Концентрационная зависимость температуры плавления PQS2.1. Скорость нагрева/охлаждения: 0,5°С/мин.

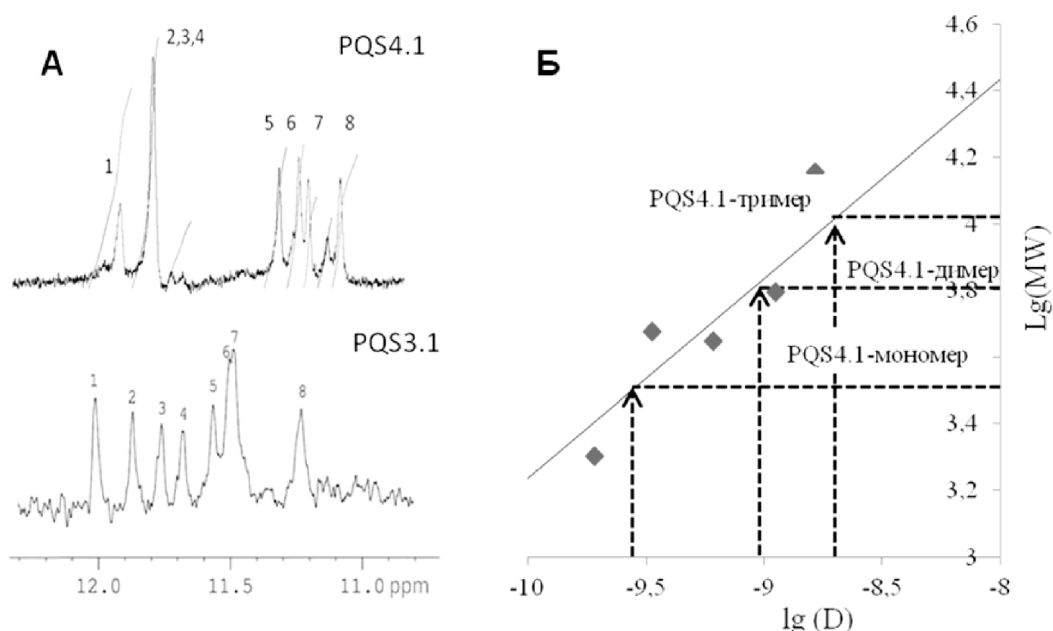


Рисунок 3. Исследование вторичной структуры Alu PQS методом спектроскопии ЯМР. А - Фрагменты одномерных протонных спектров ЯМР олигонуклеотидов PQS4.1 и PQS3.1. Б - Анализ самоассоциации PQS4.1 методом диффузионной (DOSY) ЯМР-спектроскопии. Калибровочная прямая зависимости коэффициента диффузии (Δ) от молекулярной массы (MW) в двойных логарифмических координатах построена на основании данных DOSY ЯМР для полиэтиленгликоля массы 2 кДа, лизоцима, а также известного мономолекулярного GQ TBA ($5'$ -GGTTGGTGTGGTTGG) и олигонуклеотида G3 ($5'$ -GGGTGGGTGGGTGGG). Экспериментальные значения lgD , полученные в тех же условиях для олигонуклеотида PQS4.1, соответствуют мономерным ($lg MW = 3,5$), димерным ($lg MW = 3,8$) и тримерным ($lg MW = 4,0$) структурам.

Самоассоциация PQS_{Alu}

Формирование стопок GQ олигомером PQS4.1

Образование стопок параллельных квадруплексов, стабилизированных стекинг-взаимодействиями внешних G-квартетов, отмечено ранее в нескольких работах [15, 16]. Наиболее подробно изучено формирование димеров олигонуклеотида G3 (5'-GGGTGGGTGGGTGGG) [15]. Мы предположили, что компактные двухквартетные параллельные PQS4 также склонны к самосборке в стопки (схематическое изображение стопок GQ представлено на рис. 4Б).

Действительно, при повышении концентрации олигомера PQS4.1 происходило заметное увеличение молярной эллиптичности при 265 нм, что подразумевает дополнительный стекинг тетрад одинаковой полярности (рис. 4А). Концентрационная зависимость молярной эллиптичности наблюдается и в случае контрольного параллельного квадруплекса G3 (серая кривая на рис. 4А). В качестве отрицательного контроля использовали известный антипараллельный GQ TBA (5'-GGTTGGTGTGGTTGG) и комплементарный олигонуклеотид Lcont (5'-ССААССАССААСС), не образующий GQ. Молярная эллиптичность LCont и TBA, как и ожидалось, не зависела от концентрации – амплитуда дифференциального КД-спектра близка к нулю. Очевидно, петли,

выступающие над плоскостями G-тетрад, препятствуют межквадруплексному стекингу.

Изучение самоассоциации PQS методом диффузионной (DOSY) спектроскопии ЯМР (рис. 3Б) привело к аналогичным выводам: в случае PQS4.1 удалось зафиксировать образование димеров и тримеров; контрольный параллельный GQ (G3) также формирует димеры, тогда как антипараллельный GQ (TBA) существует в растворе исключительно в виде мономеров.

Образование стопок PQS4.1 обнаружено и при анализе препаратов олигомера методом АСМ после медленного отжига. На скане, приведённом на рисунке 4Б, хорошо различимы молекулы GQ PQS4.1 и стопки GQ (выделены прямоугольниками).

Таким образом, самоассоциация олигонуклеотида PQS4.1 с образованием стабильных в физиологических условиях стопок показана тремя независимыми методами анализа.

Важно отметить, что доказательство способности представителя двухквартетных параллельных GQ (PQS4.1) к межквадруплексному стекингу с образованием димерных (GQ-GQ) и многомерных стопок свидетельствует, в совокупности с опубликованными данными, об общем характере таких взаимодействий для различных GQ параллельной топологии.

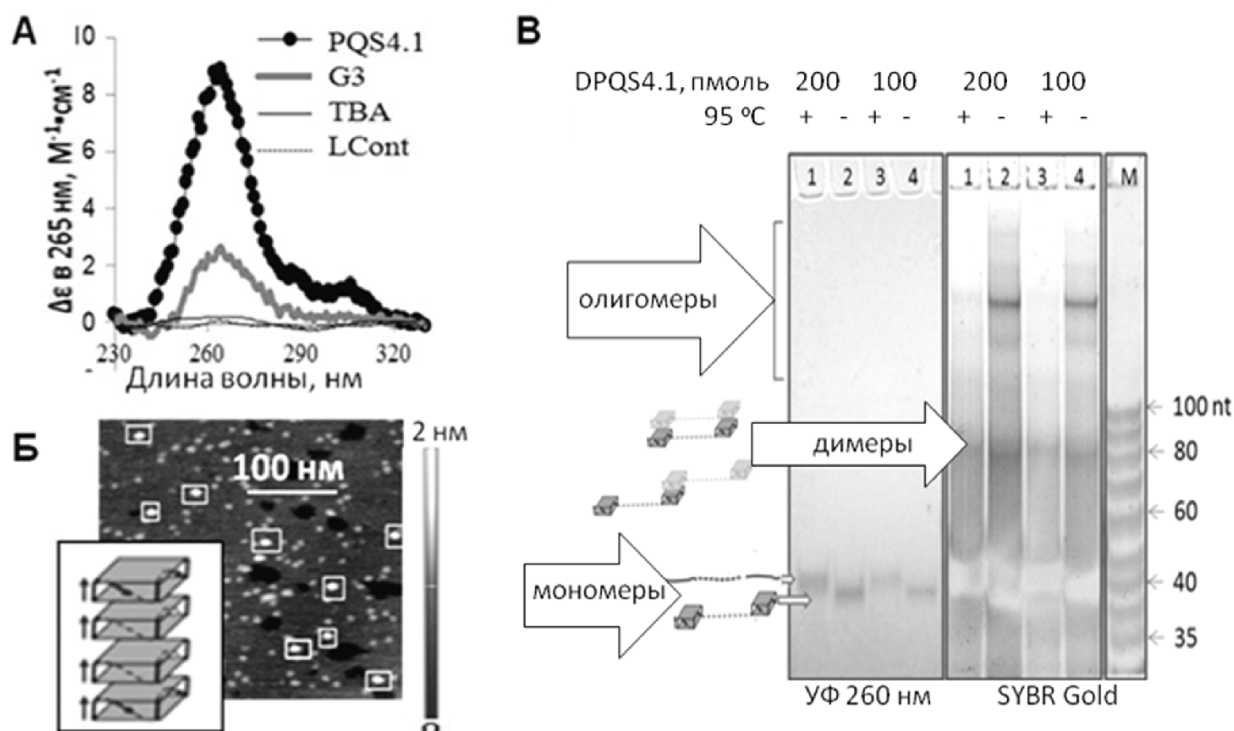


Рисунок 4. Исследование самоассоциации PQS4.1. А - Дифференциальные КД спектры - разность молярной эллиптичности, полученной при концентрациях олигонуклеотида PQS4.1 45 и 5 мкМ. Контроли: G3 (5'-GGGTGGGTGGGTGGG) - параллельный GQ; TBA (5'-GGTTGGTGTGGTTGG) - антипараллельный GQ; LCont (5'-ССААССАССААСС) - одноцепочечный олигонуклеотид, не образующий вторичных структур. Б - АСМ-анализ препарата олигонуклеотида PQS4.1 после медленного отжига (5 мкМ раствор олигомера, 10 мМ Трис-НСl, 200 мМ КCl) и принципиальная схема сборки стопок GQ. Выделены надмолекулярные сборки. В - Анализ электрофоретической подвижности в 10% ПААГ (неденатурирующие условия) олигомера DPQS4.1 после отжига. Пробы 1 и 3 перед нанесением в течение 5 мин выдерживали в течение 5 мин выдерживали в лунку олигомера. Приведены принципиальные схемы структур ассоциатов.

КОНФОРМАЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДНК Alu-ПОВТОРОВ

Процессы геномных перестроек (хромосомные транслокации и др.) подразумевают образование комплексов обменивающихся цепей после стадии разрыва сахарофосфатного остова полинуклеотидов. При гомологичной рекомбинации комплексобразование обусловлено Уотсон-Криковскими связями, при GQ-зависимых перестройках – предположительно межмолекулярными GQ. Для оценки возможного вклада в такие процессы стопок параллельных GQ в составе протяженной цепи, мы рассмотрели самоассоциацию модельного олигомера, несущего два дистальных повтора PQS4.1 (DPQS4.1, 5'-GGAGGCCGAGG-TTTTTTTTTTTTTTTT-GGAGGCCGAGG). Образование димеров и мультимеров хорошо видно при анализе состава раствора олигомера DPQS4.1 после отжига в присутствии ионов калия при ПААГ-электрофорезе в неденатурирующих условиях (рис. 4B). Нагревание смеси (5 мин, 95°C) приводило к уменьшению подвижности мономера DPQS4.1 (рис. 4B, УФ-детекция), что, вероятно, связано с расплавлением GQ структур в его составе. Следует отметить, что при этом часть димерных структур (GQ-GQ) сохраняла стабильность.

В результате этих модельных исследований показана возможность участия Alu-сайта PQS4 в формировании стабильных составных GQ и GQ-стопок – потенциальной основы межмолекулярных GQ-зависимых перестроек генома.

Межмолекулярные GQ с участием PQS2 и PQS3 сайтов Alu

PQS2 и PQS3, общей формулой 5'-GGGAGGC(C/T)GAGGC(G/A)GG, являются фрагментами tandemных повторов в составе Alu. Коровые олигомеры этих групп, как мы установили, образуют GQ антипараллельной или смешанной топологии. Они не способны ассоциироваться в стопки из-за латеральных/диагональных петель. Однако, как показано на примере PQS2.1, склонны к образованию в растворе прочных димерных GQ. Для того, чтобы проверить, сохраняется ли это свойство в составе протяженных последовательностей, получен ряд олигомеров PQS2/3-T₂₀-PQS2/3 (см. таблицу), снабжённых на концах флуоресцентной меткой (FAM) и гасителем (BHQ1).

Гашение флуоресценции, наблюдаемое после быстрого отжига разбавленных растворов олигонуклеотидов (рис. 5A), было наиболее выражено для олигомеров DPQS2, что коррелирует

Таблица. Олигонуклеотиды для FRET-анализа

Наименование	Последовательность, 5'-3'
DPQS2	FAM-TGGGAGGCCGAGGCGGG(T) ₂₀ GGGAGGCCGAGGCGGGC-BHQ1
DPQS3	FAM-TGGGAGGCCGAGGCGGG(T) ₂₀ GGGAGGCTGAGGCAGGA-BHQ1
PQS2_PQS3	FAM-TGGGAGGCTGAGGCAGG(T) ₂₀ GGGAGGCTGAGGCAGGA-BHQ1
FRET_Cont1	FAM-TGTCACCGAGACGTTT(T) ₂₀ TAGTCAGTTCGCTAGA-BHQ1
FRET_Cont2	FAM-TCAAAGTCAATCTTGACCACGTCATCG-BHQ1

Примечание. FRET_Cont1 имитирует расстояние между меткой и гасителем в неструктурированной форме; FRET_Cont2 соответствует максимальному укорочению олигомеров при формировании концевых GQ-структур. PQS2 фрагменты последовательностей подчеркнуты; PQS3 - выделены курсивом.

с преобладанием конформации бимолекулярного GQ в растворе PQS2.1 (рис. 1A и рис. 2). При термическом разрушении структур FRET-эффект отсутствовал (рис. 5B). Кривые плавления олигомеров (рис. 5B) также подтверждают образование структур PQS2-PQS2, PQS3-PQS3 и PQS2-PQS3, а КД-спектры (рис. 5Г) позволяют отнести их к GQ смешанного типа. Если предположить, что в образовании GQ участвуют по шесть концевых нуклеотидов, то в случае PQS2 сайты (5'-GGGAGG)₂ и (GGCGGG-3')₂ теоретически способны сложиться в трёхквартетный или пятиквартетный GQ с одонуклеотидными выпетливаниями. Для PQS2_PQS3 и DPQS3 участие в структуре GQ сайта GGCAGG-3' вместо GGCGGG-3' в одной и двух цепях соответственно должно приводить к снижению термической стабильности GQ (из-за уменьшения числа тетрад). Действительно, термостабильность падала в ряду: DPQS2 > PQS2_PQS3 > DPQS3 (T_{пл.} от ~60 до ~35°C, рис. 5B).

Таким образом, мы показали возможность участия локусов PQS2 и PQS3 в межмолекулярных взаимодействиях полинуклеотидов с образованием бимолекулярных GQ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате системных исследований впервые показана способность трёх консервативных фрагментов Alu формировать *in vitro* стабильные внутри и межмолекулярные GQ, установлено присутствие неканонических структур в составе Alu ДНК, подтверждена генно-регуляторная роль Alu-повторов и вторичной структуры их G-богатых фрагментов.

Анализ G-богатых фрагментов Alu на уровне олигонуклеотидных моделей позволил установить три локуса, способных в физиологических условиях участвовать в формировании высокостабильных GQ различной топологии.

Изучение способов самоассоциации PQS Alu, в том числе дистально расположенных в составе протяжённой одноцепочечной ДНК (DPQS4.1, PQS2-PQS2, PQS3-PQS3 и PQS2-PQS3), с образованием бимолекулярных GQ (PQS2/3) и стабильных GQ-стопок (PQS4), позволило сделать предположение об их участии в межмолекулярных GQ-зависимых перестройках, характерных для процессов негомологичной рекомбинации и транслокации, с возможной реализацией двух GQ-зависимых механизмов (рис. 6).

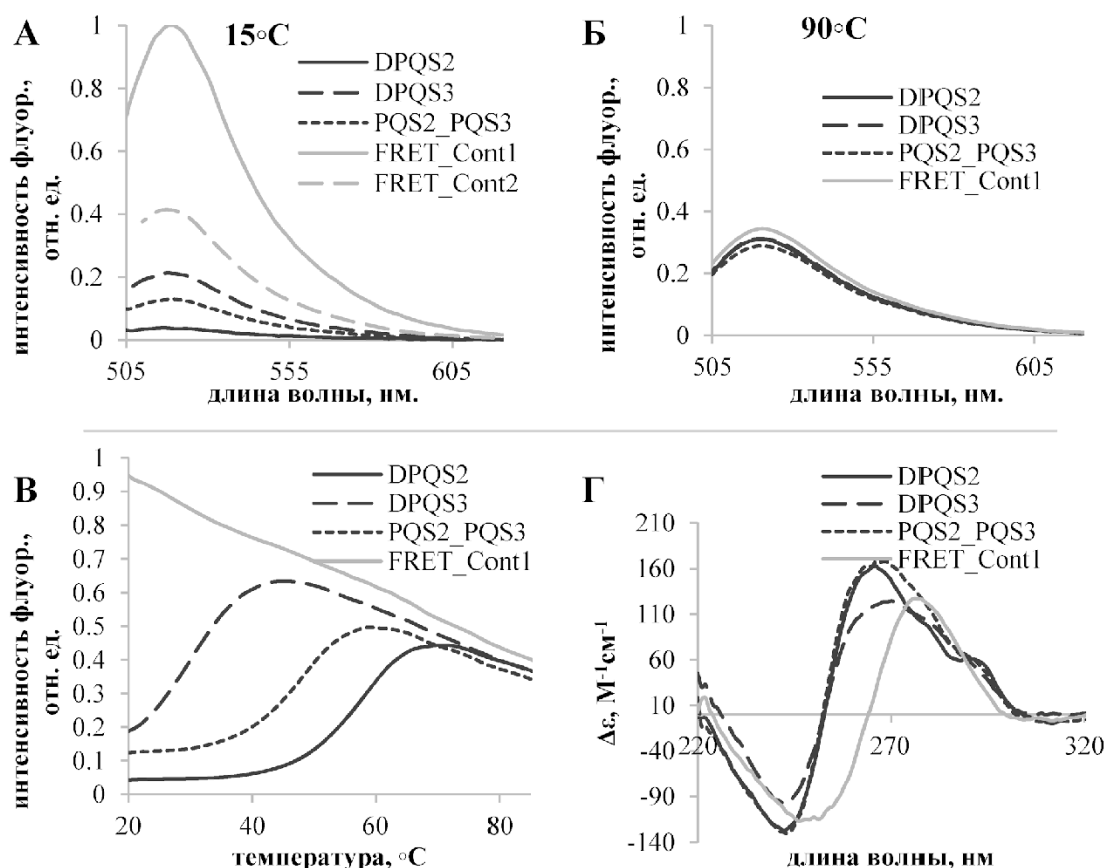


Рисунок 5. Формирование внутримолекулярных GQ из дистальных PQS2/3. А - Спектры флуоресценции олигомеров DPQS2, DPQS3, PQS2_PQS3 и контрольных олигомеров при 15°C. Б - Спектры флуоресценции при 90°C. В - Профили термической денатурации. Г - КД-спектры за вычетом спектра спейсера T20.

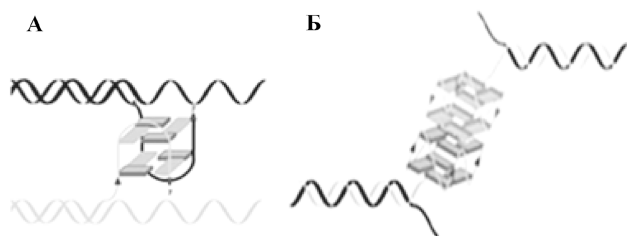


Рисунок 6. Принципиальные схемы межмолекулярных взаимодействий фрагментов двух цепей полинуклеотидов, стабилизированных образованием GQ. А - GQ формируется из G-богатых сайтов никированных/разорванных по обеим цепям ДНК или одностранных локусов ДНК и РНК. Б - Межмолекулярная структура стабилизирована стекингом параллельных GQ, сложившихся в каждой из цепей. Схемы взаимодействий носят общий характер, двухквартетные структуры приведены в качестве примера.

Отметим, что формирование межмолекулярных GQ (рис. 6А) возможно для различных PQS и G-богатых последовательностей, несущих не менее двух G-блоков. Механизм GQ-GQ стекинга (рис. 6Б) также можно рассматривать как универсальный для параллельных GQ разного состава. С этой точки зрения ассоциация G-богатых мотивов Alu с чувствительными к разрывам и перестройкам локусами [12] может быть обусловлена не столько особенностями структуры G-богатых фрагментов Alu,

сколько высокой представленностью этих повторов в геноме.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда РФ № 14-25-00013.

ЛИТЕРАТУРА

- Loomis E.W., Sanz L.A., Chedin F., Hagerman P.J. (2014) PLoS Genet., **10**, e1004294.
- Murat P., Zhong J., Lekieffre L., Cowieson N.P., Clancy J.L., Preiss T., Balasubramanian S., Khanna R., Tellam J. (2014) Nat. Chem. Biol., **10**, 358-364.
- Harris L.M., Merrick C.J. (2015) PLoS Pathog., **11**, e1004562.
- Cahoon L.A., Seifert H.S. (2009) Science, **325**, 764-767.
- Metifiot M., Amrane S., Litvak S., Andreola M.L. (2014) Nucleic Acids Res., **42**, 12352-12366.
- Javadekar S.M., Raghavan S.C. (2015) FEBS J., **282**, 2627-2645.
- Секридова А.В., Варижук А.М., Татарина О.Н., Северов В.В., Баринев Н.А., Смирнов И.П., Лазарев В.Н., Клинов Д.В., Позмогова Г.Е. (2016) Биомед. химия, **62**, 535-543.
- Kriegs J.O., Churakov G., Jurka J., Brosius J., Schmitz J. (2007) Trends Genet. **23**, 158-161.
- Batzer M.A., Deininger P.L. (2002) Nat. Rev. Genet. **3**, 370-379.
- Лукьянова Т.А., Зайцева М.А., Карнов В.А., Позмогова Г.Е. (2008) Биоорган. химия, **34**, 83-88.

11. Ackermann D., Rasched G, Verma S, Schmidt T.L., Heckel A., Fatulok M. (2010) Chem. Commun. (Camb), **46**, 4154-4156.
12. Бессчетнова И.А., Позмогова Г.Е., Чувиллин А.Н., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. (2006) Мол. биология, **40**, 489-496.
13. Abu-Ghazalah R.M., Irizar J., Helmy A.S., Macgregor R.B. Jr. (2013) Biophys. Chem., **147**, 123-129.
14. Konkel M.K., Batzer M.A. (2010) Semin. Cancer Biol., **20**, 211-221.
15. Do N.Q., Lim K.W., Teo M.H., Heddi B., Phan A.T. (2011) Nucleic Acids Res., **39**, 9448-9457.
16. Tothova P., Krafcikova P., Viglasky V. (2014) Biochemistry, **53**, 7013-7027.

Поступила: 20. 05. 2016.
Принята к печати: 28. 07. 2016.

CONFORMATIONAL POLYMORPHISM OF G-RICH FRAGMENTS OF DNA ALU-REPEATS. II. THE PUTATIVE ROLE OF G-QUADRUPLEX STRUCTURES IN GENOMIC REARRANGEMENTS

A.M. Varizhuk, A.V. Sekridova, M.V. Tankevich, V.S. Podgorsky, I.P. Smirnov, G.E. Pozmogova

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; tel.: +74992464696; fax: +74992464409;
e-mail: pozmge@niifhm.ru

Three evolutionary conserved sites of Alu repeats (PQS2, PQS3 and PQS4) were shown to form stable inter- and intramolecular G-quadruplexes (GQs) *in vitro*. Structures and topologies of these GQs were elucidated using spectral methods. Self-association of G-rich Alu fragments was studied. Dimeric GQ formation from two distal identical or different putative quadruplex sites – (PQS2)₂, (PQS3)₂ or PQS2-PQS3 – within one lengthy DNA strand was demonstrated by a FRET-based method. Oligomer PQS4 (folded into a parallel intramolecular GQ) was shown to form stacks of quadruplexes that are stabilized by stacking interactions of external G-tetrads (this was confirmed by DOSY NMR, AFM microscopy and differential CD spectroscopy). Comparative analysis of the properties of various GQs allowed us to put forward a hypothesis of two general mechanisms of intermolecular GQ-dependant genomic rearrangements: 1) formation of a dimeric GQs; 2) association of pre-folded intramolecular parallel GQs from different strands into GQ-stacks. Thus, the observed co-localization of G-rich motifs of Alu elements with double-strand break hotspots and rearrangement hotspots may be accounted for by the specific secondary structure of these motifs. At the same time, this is likely primarily due to high abundance of such G-rich Alu fragments in the genome.

Key words: G-quadruplex DNA, Alu-repeats, dynamics of DNA secondary structures