

©Коллектив авторов

Г-КВАДРУПЛЕКСЫ У БАКТЕРИЙ: ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОМИШЕНЕЙ

Е.А. Шитиков*, Д.А. Беспярых, И.Н. Бодоев, М.В. Зайчикова

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
Москва, 119435, ул. Малая Пироговская, 1а; *эл. почта: eshitikov@mail.ru

Г-квадруплексы (G4), представляющие собой неканонические вторичные структуры ДНК, интенсивно исследуются на протяжении длительного времени. У эукариот они играют важную роль в регуляции экспрессии генов и репарации ДНК. G4 также были обнаружены в геномах многочисленных бактерий и архей, однако их функциональная роль окончательно не выяснена. Известно, что G4 участвуют в формировании антигенной изменчивости, патогенности, антибиотикоустойчивости и выживании в экстремальных условиях. Разработано достаточно много инструментов по обнаружению потенциальных G4 последовательностей и подтверждению их формирования. Поскольку контролируемое образование и разрешение квадруплекса представляет собой важный инструмент регуляции критически значимых для выживания генов, перспективным направлением исследований является поиск лигандов — соединений, способных оказывать на структуру квадруплекса стабилизирующее действие и тем самым останавливать экспрессию генов. В настоящее время уже известен ряд лигандов, применение которых останавливает рост патогенных микроорганизмов. G4-лиганды представляют интерес в качестве потенциальных противомикробных препаратов, что является чрезвычайно актуальным в связи с широким распространением патогенных микроорганизмов с лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: квадруплексы; вторичная структура ДНК; антигенная изменчивость; лиганды; регуляция транскрипции

DOI: 10.18097/PBMC20226802093

ВВЕДЕНИЕ

Открытие Д. Уотсоном и Ф. Криком В-формы молекулы ДНК стало знаковым событием в истории молекулярной биологии и генетики и вектором для дальнейших исследований [1]. Вскоре после этого было обнаружено, что нуклеиновые кислоты могут формировать множество биологически значимых вторичных структур, не являющихся каноническими. К таким альтернативным структурам относятся тройные спирали, i-мотивы, гуаниновые квадруплексы (G-квадруплексы), R-петли и др. [2].

G-квадруплексы (G4) — это неканонические вторичные структуры, формирующиеся в физиологических условиях гуанинсодержащими последовательностями ДНК и РНК [3, 4]. При этом четыре гуаниновых основания разных нитей или одной цепи образуют структурную единицу квадруплекса, называемую G-квартет или G-тетрада. Каждый G-квартет стабилизируется водородными связями, образованными взаимодействием Уотсон-Криковской стороны одного гуанинового основания с Хугстиновской стороной другого. G-квартеты удерживаются между собой π - π -стекинг взаимодействием, а также дополнительно стабилизируются катионами металлов [5] (рис. 1А).

Прототип минимальной G4-формирующей последовательности может быть представлен формулой $G_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}N_xG_{\geq 3}$, где $G_{\geq 3}$ — количество гуанинов в G-блоке, непосредственно задействованных в образовании G-квартетов, а N_x — комбинация любых нуклеотидных остатков, формирующих петлю между G-квартетами (рис. 1Б). В зависимости

от количества участвующих нитей ДНК или РНК, G4 можно разделить на внутримолекулярные (одна цепь образует G4) и межмолекулярные (несколько нитей участвуют в образовании G4). Исходя из относительной ориентации участвующих нитей, G4 называется “параллельным”, если все нити имеют одинаковую ориентацию, “гибридным” и “антипараллельным”, если одна или две нити соответственно имеют направление, противоположное другим [6-8] (рис. 1В).

G4 структуры играют ключевую роль в поддержании целостности генома путём регуляции фундаментальных биологических процессов, включая репликацию, транскрипцию, процессинг РНК, рекомбинацию ДНК и поддержание теломер [9]. Эти функции в большей степени изучены для эукариот и зависят от локализации квадруплексных мотивов. Так, например, наличие G4 в 5'-нетранслируемой области мРНК предполагает регуляторную роль в экспрессии гена путём ингибирования или активации трансляции [10]. В свою очередь, локализация в 3'-нетранслируемой области, вероятно, препятствует трансляции и влияет на полиаденилирование, а также субклеточную локализацию мРНК [11, 12]. Наличие G4 в промоторных областях многочисленных протоонкогенов, включая *bcl-2* [13], *c-myc* [14], *c-kit* [15], *c-myb* [16], *VEGF* [17] и *KRAS* [18], также связывают с регуляторной ролью неканонических структур и их влиянием на развитие и прогрессию рака. Помимо локализации, на экспрессию гена может оказывать влияние ориентация квадруплексной последовательности. В антисмысловой нити ДНК G4 могут существенно подавлять транскрипцию гена,

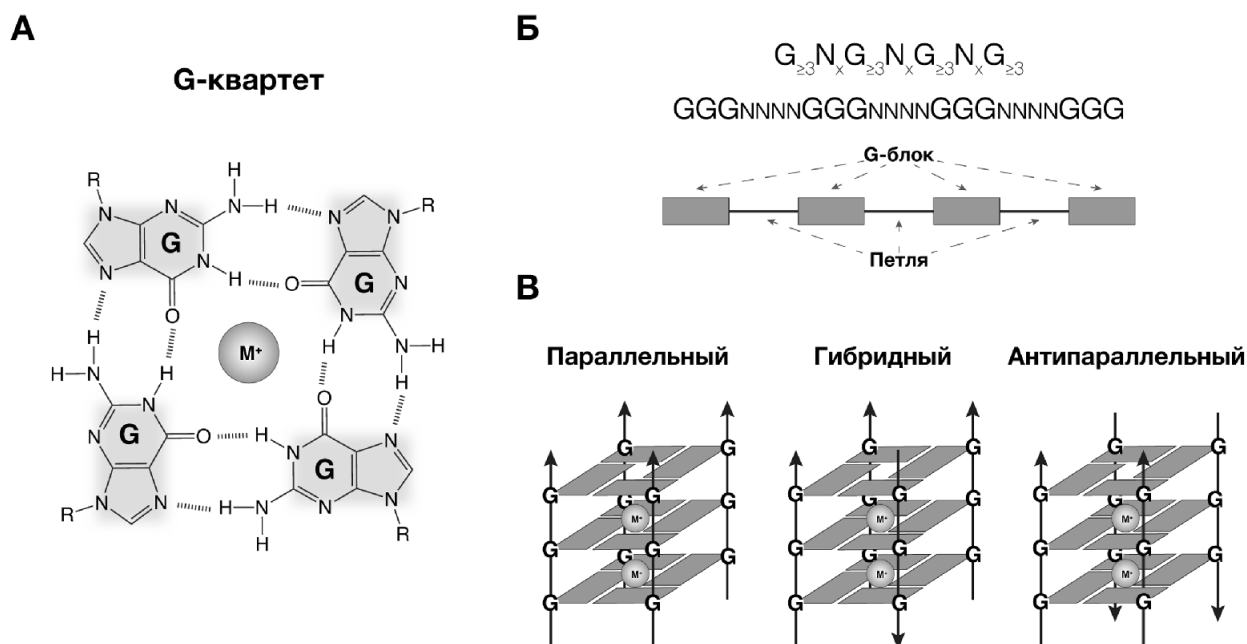


Рисунок 1. Структура G-квадруплекса. **А)** Химическая структура гуанинового квартета с координированным одновалентным катионом M^+ ; **Б)** линейный вид вероятной G4-формирующей последовательности; **В)** схематическое изображение основных топологий G4.

в то время как в смысловой нити они не влияют на транскрипцию, хотя в конечном итоге снижают трансляцию [19].

Неравномерное распределение в геноме G4 последовательностей также служит дополнительным подтверждением их регуляторных функций. G4 высоко представлены в теломерных районах хромосом, микро- и минисателлитных повторах, в регуляторных участках, таких как промоторы, первый интрон, энхансеры, инсуляторы и др. [20]. При этом консервативность локализации характерна не только для высших организмов, но и для вирусов и бактерий [21, 22]. Здесь следует отметить, что изучение G4 на микробных системах отстаёт от схожих исследований в эукариотических организмах, однако имеющиеся публикации свидетельствуют о существенном влиянии G4 на физиологию бактерий [23]. G4 структуры связаны с устойчивостью к лекарственным препаратам, регуляцией вирулентности, антигенной изменчивостью, выживанием в стрессовых условиях и др. [24-26].

Вовлеченность в биологические процессы открывает большие перспективы по использованию G4-формирующих последовательностей в качестве терапевтических мишеней. На сегодняшний день описано значительное количество низкомолекулярных соединений, G4-лигандов, способных связываться с квадруплексными последовательностями, тем самым влияя на их термическую стабильность [27, 28]. Взаимодействие лигандов с G4 структурами может приводить к нарушению действия различных белковых факторов и ферментов, функционально связанных с ДНК или РНК, и подавлять или активировать транскрипцию. При этом широкое разнообразие нуклеотидного состава G4 может

обеспечивать высокую селективность распознавания лигандами, и в конечном счёте модулирование экспрессии определенных биологических систем [29]. Интенсивные исследования научных групп в этой области позволили найти высокоаффинные G4-лиганды, обладающие антибактериальными, противоопухолевыми и противовирусными свойствами [30-32], однако точные механизмы их действия до конца не изучены.

В последние годы опубликован ряд обзоров, в которых рассматривается функциональная роль квадруплексных структур у бактерий, однако зачастую работы включают исследования вирусов и паразитических простейших [24, 33]. В этих работах поверхностно затронуты темы использования G4 в качестве потенциальных мишеней для противовирусных препаратов [24], а также использования аптамеров G4 для диагностики и терапии инфекционных заболеваний [33]. В представленном обзоре рассматриваются исключительно квадруплексные структуры, обнаруженные в геномах бактерий, способы их идентификации *in silico*, функциональная роль, и, главное, перспективы использования G4-стабилизирующих соединений для влияния на метаболические процессы в клетке и в качестве противомикробных препаратов с принципиально новым механизмом действия.

1. G4-ФОРМИРУЮЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В БАКТЕРИЯХ

Сегодня доступно довольно много инструментов для *in silico* идентификации потенциальных квадруплекс-формирующих последовательностей (putative quadruplex sequence, PQS). Первыми

из разработанных инструментов были Quadparser [34] и Quadfinder [35], основанные на правиле складывания, которое гласит, что четыре идеальных G-блока с более короткими петлями образуют наиболее стабильные квадруплексы ($G_3+X_{1-7}G_3+X_{1-7}G_3+X_{1-7}G_3$). QGRS Mapper [36] использует более гибкое правило складывания — количество G-блоков от двух и длина петли до 45 оснований. На похожем принципе складывания основаны Quadbase2 [37], ImGQfinder [38] и PQSfinder [39]. Из них Quadbase2 и ImGQfinder являются более простыми поисковыми системами, которые сильно ограничивают конфигурацию определяемых пользователем параметров. Также были разработаны такие поисковые системы, как G4 potential calculator [40] и G4Hunter [41], которые используют метод скользящего окна вместо правил складывания квадруплекса. Система оценки, имплементированная в G4Hunter, оценивает G-обогащённость и C-асимметрию, а также учитывает экспериментальный дестабилизирующий эффект, вызванный близлежащим присутствием цитозина в G-квадруплексе (поскольку он может образовывать пару оснований с гуанином и в конечном итоге препятствовать образованию квадруплекса [42]). Последним и наиболее совершенным на данный момент инструментом для поиска PQS является G4-iM Grinder [43] — быстрый, надёжный и легко адаптируемый алгоритм. Он способен находить, идентифицировать и квалифицировать PQS в ДНК и РНК. G4-iM Grinder учитывает

биологическую релевантность, вероятность *in vitro* формирования и наличие в геноме уже известных подтверждённых *in vitro* структур.

За последние несколько лет было опубликовано большое количество исследований, посвящённых *in silico* поиску квадруплексов в составе геномов различных организмов, в том числе и бактерий. Потенциальные квадруплекс-формирующие последовательности, а также подтверждённые *in vivo* G4 были обнаружены во всех известных бактериальных геномах [43–45]. Средняя частота PQS для геномов составляет 1,342 PQS на 1000 пар нуклеотидов (п.н.) [45]. Самая низкая средняя плотность — у типа *Thermotogae* (0,394), а самая высокая — у группы PVC (*Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и *Chlamydiae*) (1,646), за которой следует *Terrabacteria* (1,601) (рис. 2А). При этом грамположительные бактерии обладают довольно низкой плотностью PQS; среди них можно выделить род *Staphylococcus*, который обладает наименьшей плотностью PQS. Исключение составляет род *Mycobacterium* (представители которого являются возбудителями лепры и туберкулеза), а также бактерии рода *Corynebacterium*, вызывающие дифтерию. Плотность PQS у этих бактерий может превосходить и даже дублировать среднюю плотность PQS в геноме человека (2,488) [46]. Напротив, большинство геномов грамотрицательных микроорганизмов можно сгруппировать по их особенно высокой плотности PQS, из которых *Pseudomonas aeruginosa* демонстрирует самую высокую плотность PQS [43, 44]. За ними

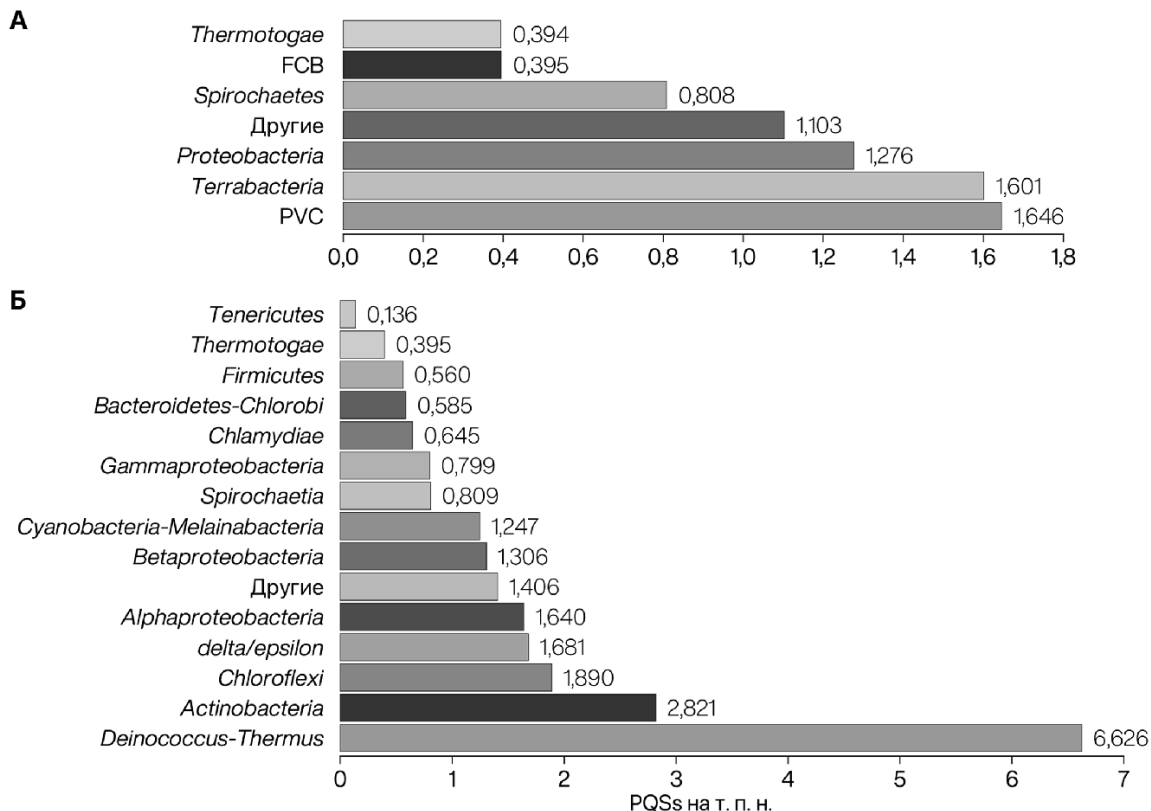


Рисунок 2. Частоты PQS в геномах различных бактериальных типов (А) и классов (Б). FCB — *Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes*; PVC — *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и *Chlamydiae*. Использованы данные Bartas и соавт. [45].

следуют *Brucella melitensis* и *Neisseria meningitidis* (возбудители бруцеллёза и менингита соответственно). Несколько подтверждённых *in vitro* известных форм квадруплексов были также обнаружены у *Treponema pallidum* — возбудителя сифилиса [47].

В ходе исследований бактериальных геномов было обнаружено, что содержание GC пар у грамположительных и грамотрицательных бактерий связано с предполагаемым присутствием G4. Однако взаимосвязь между GC-составом и присутствием PQS не линейная, и другие факторы, например геномная организация или распределение GC в геноме, также могут играть ключевую роль в присутствии потенциальных G4. Так, плотность высоковероятных PQS в геноме *P. aeruginosa* составляет менее половины от плотности таковых в геноме человека, в то время как GC-состав бактерии составляет ~66% по сравнению с ~40% у человека [44].

С точки зрения локализации, G4-формирующие последовательности у бактерий обнаружены в промоторных областях генов, относящихся к транскрипции, сигнальным системам и синтезу вторичных метаболитов, при этом самая высокая частота PQS наблюдается до или после транспортной РНК (тРНК), внутри транспортно-матричной РНК (тмРНК) и рибосомальной РНК (рРНК). Самая низкая частота PQS встречается до и после ДНК маркирующих сайтов и рРНК [21, 45].

Отдельно следует отметить, что у бактерий, в отличие от эукариот, в основном представлены квадруплексные структуры, образуемые ДНК, а РНК-квадруплексы (RG4) не играют значимой роли [21, 48]. Однако последние исследования показали, что у *P. aeruginosa* и *Escherichia coli* RG4 принимают участие в регуляции генов *hemL* и *bswR* соответственно [49].

2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ КВАДРУПЛЕКСОВ

Квадруплексные структуры у прокариот, как говорилось выше, влияют на различные аспекты физиологии бактерий, в том числе на выживание в неблагоприятных условиях, взаимодействие с макроорганизмом и т.д. Влияние вторичных структур ДНК на метаболизм заключается, главным образом, в регулировании экспрессии различных генов, кодирующих специфические белки, задействованные в этих процессах (рис. 3).

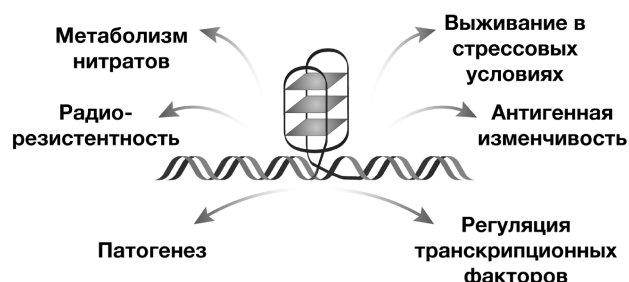


Рисунок 3. Функциональная роль ДНК-G4 у микроорганизмов.

2.1. Роль G4 в регуляции транскрипционных факторов

Впервые участие G4 в регуляции транскрипционных факторов было изучено на примере *E. coli*. Анализ регуляторных регионов выявил связь G4-структур с сайтами связывания генов значимых транскрипционных факторов Lrp, GlpR, FIS, а также RpoD (σ^{70}) и RpoS (σ^S). Lrp, GlpR, FIS и RpoD в совокупности контролируют не менее тысячи генов, экспрессируемых на стадии экспоненциального роста [50]. Данные последовательности склонны к отрицательной суперспирализации, характерной, в частности, для стрессовых условий [51]. При этом происходит дестабилизация дуплекса, что облегчает формирование G4 [33]. G4, в свою очередь, могут модулировать транскрипцию вышеперечисленных факторов, обеспечивая адаптивный ответ. Вместе с тем сигма-фактор σ^S , задействованный в регуляции более 100 генов, экспрессируемых в стационарной фазе, также регулируется G4 за счёт ингибирования его сайтов-мишеней. При переходе к стационарной фазе роста происходит снижение степени суперспирализации ДНК и индукция σ^S при подавлении σ^{70} . Таким образом, формирование G4 способствует переключению σ^{70}/σ^S при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе [21].

2.2. Роль G4 в регуляции экспрессии генов в стрессовых условиях

G4 играют значимую роль в ответе на стресс. Это отчасти может быть объяснено тем, что в стрессовых условиях увеличивается внутриклеточная концентрация K^+ , который оказывает на квадруплексы стабилизирующее действие [52].

PQS в составе бактериальных геномов были обнаружены в промоторных областях ряда генов, задействованных в реакции на стресс, что позволило предположить их участие в регуляции экспрессии данных генов. В частности, G4-структуры были идентифицированы перед генами *oxyR*, *relA* и *rseA*, участвующими в реакции на окислительный, азотный, тепловой и осмотический шок [53].

Интересной функцией G4-структур является их участие в формировании устойчивости к радиации, впервые показанной ещё на примере генома человека [54]. Подобная особенность была подтверждена и для бактериальной ДНК. В одном из исследований было проведено сравнение радиочувствительности 14 генов *Salmonella typhimurium*, GC-состав которых варьировал в диапазоне от 32% до 73%. Наименьшая радиочувствительность оказалась присуща генам *cstA* и *cstB*, GC-состав которых был около 70% [55]. Отмечено также, что для радиорезистентных бактерий, включая *Deinococcus radiodurans*, *Kineococcus radiotolerans* и *Symbiobacterium thermophilum*, тоже характерно высокое содержание GC по сравнению с чувствительными к радиации видами бактерий [56, 57].

Известным примером непосредственного участия G4 в формировании радиорезистентности является *D. radiodurans*, который характеризуется

высоким уровнем устойчивости к ионизирующему излучению. Эта особенность во многом зависит от генов *mutL*, *recA*, *recF*, *recO*, *recR* и *recQ*, задействованных в репарации ДНК. Исследования выявили наличие G4-богатых мотивов в областях протяжённостью 200 п.н., расположенных непосредственно перед этими генами и принимающих участие в их регуляции [25].

У *Mycobacterium tuberculosis* содержание GC также достаточно велико и составляет 65%; для этого микроорганизма доказана возможность образования квадруплексных структур *in vivo*, однако неясно, играют ли они какую-то роль в радиорезистентности [58]. Следует отметить, что радиорезистентность является чертой, не подвергающейся давлению естественного отбора, и, вероятно, сформировалась опосредованно, как пример экзаттации, в составе целого комплекса механизмов, направленных на восстановление повреждений ДНК в экстремальных условиях, таких как высыхание, воздействие УФ, высоких температур, окислительного стресса [59].

2.3. G4-опосредованная антигенная изменчивость

G4 задействованы также в реализации антигенной изменчивости у патогенных микроорганизмов. Поскольку иммунная система хозяина способна к распознаванию определённых поверхностных эпитопов патогена, их изменение позволяет избежать обнаружения иммунными клетками. Патоген может обладать набором генов, кодирующих различные эпидоты, но экспрессировать, в зависимости от ситуации, только один. У ряда патогенных микроорганизмов присутствует единый сайт регуляции для всех генов. Регуляция экспрессии опосредована различными генетическими и эпигенетическими механизмами, включая образованные G4.

Наиболее известным примером является возбудитель гонореи *Neisseria gonorrhoeae*. У данного микроорганизма существует G4-опосредованная система переключения экспрессии гена *pilE* и молчащих локусов *pilS*, кодирующих поверхностный белок пилин и его варианты соответственно. Она представляет собой расположенную выше сайта транскрипции G-богатую последовательность из 16 пар оснований, для которой *in vitro* доказана способность к формированию G4. При этом происходит разрыв ДНК, который устраняется при помощи гомологичной рекомбинации с *pilS* [26, 60].

Сходная ситуация наблюдается у *Borrelia burgdorferi* — возбудителя болезни Лайма. Геном этой бактерии содержит локус *vls*, кодирующий набор антигенных вариантов и состоящий непосредственно из сайта экспрессии *vlsE* и молчащих каскадов *vls*, которые кодируют вариации VlsE [61].

У *T. pallidum*, отличительной особенностью которого является способность избегать иммунного ответа хозяина и сохраняться в организме на протяжении длительного времени, антигенная изменчивость опосредована вариациями локализованного на наружной мембране белка TrpK,

которые происходят в семи вариабельных областях (V1-7) [62]. В проксимальной части локуса *trpK* были идентифицированы последовательности, потенциально способные к образованию квадруплексных структур, что, возможно, указывает на сходный с *N. gonorrhoeae* механизм антигенной изменчивости [47].

2.4. Роль G4 в патогенезе

Патогенные микроорганизмы существуют в постоянно меняющихся условиях и часто подвергаются стрессовому воздействию, включая иммунную реакцию организма-хозяина. В связи с этим регуляция экспрессии генов, направленная на быструю смену протеома, приобретает решающее значение.

Для *Salmonella enterica* — возбудителя кишечных инфекций — было установлено наличие PQS в регуляторных областях генов, вовлечённых во взаимодействие с организмом хозяина и в формирование устойчивости к азотному и окислительному стрессу. Так, они присутствуют в промоторной области гена *mgtA*, кодирующего транспортную Mg^{2+} -АТФазу, участвующую в реакции на нитроокислительный стресс, в открытой рамке считывания гена *entA*, кодирующего сидерофоры энтеробактин и сальмохелин, в регуляторных областях генов *malK* и *malE*, вовлечённых в транспорт важного для патогена источника углерода — мальтозы. Высококонсервативные PQS были идентифицированы в регуляторной области *mgtA*, в открытой рамке считывания *entA* и в регуляторных областях генов *malK* и *malE* [63]. Образование квадруплексных структур в данных областях было подтверждено с использованием ядерного магнитного резонанса, кругового дихроизма и изменения электрофоретической подвижности.

PQS были обнаружены также в регулирующих областях генов *hsdS*, *recD* и *pmrA* распространённого патогенного микроорганизма *Streptococcus pneumoniae*, вызывающего инфекции различной локализации. Данные гены крайне важны для выживания бактерии, поскольку *recD* задействован в репарации ДНК, *hsdS* участвует в регуляции системы рестрикции-модификации, а ген *pmrA* кодирует трансмембранный белок, вовлечённый в формирование лекарственной толерантности, опосредованной выведением лекарств из клетки [64].

Ещё одним патогеном, в геноме которого были обнаружены PQS, является *Klebsiella pneumoniae*. PQS идентифицированы в промоторных областях генов, задействованных в транспорте и метаболизме. Так, они расположены в промоторной области гена *KPHS_44220*, вовлечённого в синтез витамина B6, *KPHS_00580*, задействованного в метаболизме углеводов, *KPHS_07730*, вовлечённого в метаболизм L-арабинозы, *KPHS_46430*, участвующего в метаболизме жирных кислот и витамина B6. Две PQS также локализованы в промоторной области гена, кодирующего ABC-транспортер [65].

У *M. tuberculosis* PQS обнаружены в промоторных областях генов *espK*, *espB* и *cyp51*, являющихся значимыми факторами вирулентности

(*espK* и *espB* предотвращают слияние макрофага и лизосомы, приводящее к образованию фаголизосомы, а *sup51* участвует в биосинтезе стеролов и образовании мембран) [58].

2.5. G4 как регулятор метаболизма нитратов

G4 задействованы в транскрипционной адаптации *Paracoccus denitrificans* к нитратзависимому анаболизму. Данный микроорганизм использует нитраты как в качестве акцептора дыхательных электронов в анаэробных условиях, так и в качестве источника азота в аэробных и в анаэробных условиях. Ключевую роль в этом играет система Nas, включающая целый кластер генов *nasABGHIC*, регулируемый двухкомпонентной системой *nasTS* и представляющий собой единую транскрипционную единицу [66]. В межгенной области на 150 нуклеотидов выше *nasT* расположен участок, включающий 21 нуклеотид и способный к образованию квадруплексной структуры.

3. РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КВАДРУПЛЕКСОВ

Молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции образования и разрешения G4, изучены недостаточно. В эукариотических клетках основными белками, способными специфически связываться и разворачивать G-квадруплексные структуры, являются топоизомеразы и хеликазы. Во время транскрипции ДНК топоизомераза I удаляет как отрицательные, так и положительные суперспирали, индуцированные работой РНК-полимеразы, и тем самым играет критическую роль в подавлении нестабильности генома, опосредованной неканоническими вторичными структурами, такими как G4 и R-петли [67, 68]. Среди хеликаз особого внимания заслуживают следующие семейства: RecQ (человеческие BLM и WRN и дрожжевые Sgs1), XPD с направленностью от 5' до 3' (человеческие FANCD1 и *Caenorhabditis elegans* DOP-1) и Pif1 [69-72].

Гомологичные белки также были найдены и у бактерий. К⁺-зависимая топоизомераза типа IB, DraTopoIB, была выделена у *D. radiodurans* [73] и демонстрировала способность дестабилизировать вторичные структуры. Так, в экспериментах по торможению ДНК-полимеразы из-за стабилизации G4 структур G4-связывающими лигандами, добавление рекомбинантного DraTopoIB приводило к получению полноразмерного продукта. В свою очередь, добавление ингибитора топоизомеразы I камптотецина блокировало полимеразную реакцию.

Основной бактериальной хеликазой, участвующей в разрешении G4, является RecQ. В экспериментах с *E. coli* показано, что RecQ способна разрешать квадруплексные структуры по АТФ-зависимому механизму в присутствии двухвалентных катионов в качестве кофакторов [74]. Схожая активность была определена для хеликазы/транслоказы UvrD *E. coli* [75], а также Rep [76]. В дополнение к хеликазам рекомбиназа RecA в активной форме способна разрешать G4 структуры и удалять G4-стабилизирующие лиганды *in vitro* [76].

Интересными, в связи с вышеупомянутым, выглядят исследования бактерий вида *M. tuberculosis*, геном которых обладает высоким GC-составом, однако не кодирует гомолога RecQ. В микобактериях было обнаружено два ортолога хеликазы UvrD *E. coli*, UvrD1 и UvrD2 [77]. Оба фермента способны разрешать G4-структуры по АТФ-зависимому механизму и поддерживать целостность генома. Другая хеликаза, DinG, которая содержит железосерный кластер, также раскручивает G4-структуры в *E. coli* и *M. tuberculosis* [78].

4. G-КВАДРУПЛЕКСЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ МИШЕНИ

Нерациональное использование антибактериальных препаратов в медицинской практике привело к повсеместному распространению устойчивых микроорганизмов. В связи с этим всё большую актуальность приобретают задачи по разработке альтернативных методов лечения и поиску новых терапевтических мишеней для борьбы с устойчивостью к противомикробным препаратам. Исходя из широты выполняемых функций, бактериальные G4 вполне могут стать такими новыми мишенями, а G4-лиганды — новыми потенциальными антибиотиками.

Первоначально G4-стабилизирующие соединения использовались в качестве инструмента для изучения биологической роли квадруплексов. В частности, использование лигандов ТМРyР4 (катионный порфирина) и 1 (производное бензофеноксазина) у *P. denitrificans* продемонстрировало снижение экспрессии оперона *nasABGHIC*, участвующего в метаболизме нитратов, за счёт стабилизации G4, расположенного в промоторной области регуляторного гена. Таким образом, было доказано существование лиганд-специфического контроля NO₃-зависимого роста [79]. В случае с *D. radiodurans* добавление G4-стабилизирующего лиганда N-метилмезопорфирина снижало экспрессию связанных с репарацией генов и приводило к уменьшению устойчивости к гамма-излучению. Подобное явление было отмечено и у родственного ему организма *D. geothermalis* [25].

В дальнейшем возможность использования G4-лигандов в качестве потенциальных противомикробных средств была показана для таких патогенов как *M. tuberculosis* [58, 80], *K. pneumoniae* [65], *S. enterica* [63], *S. pneumoniae* [64] и *Vibrio cholerae* [81] (таблица). В случае с *S. pneumoniae* был установлен стабилизирующий эффект хорошо изученного G4-лиганда ТМРyР4 на квадруплексы, находящиеся в генах *hdsS*, *recD* и *pmrA*, продукты которых ассоциированы с вирулентностью, ДНК репарацией и эффлюксом соответственно [65]. Схожее исследование было проведено и для *V. cholerae*: авторы продемонстрировали эффект на 10 консервативных квадруплексах, находящихся в важных для жизнедеятельности генах [81]. Для *K. pneumoniae* был показан стабилизирующий эффект лиганда

Таблица. Влияние G4-лигандов на патогенные бактерии

Бактерия	Локализация G4	G4-лиганд	Влияние на микроорганизм <i>in vivo</i>
<i>M. tuberculosis</i>	промоторная область	c-exNDI-2 и BRACO-19	подавление роста [80]
	гены	ТМРyP4	подавление роста [58]
<i>K. pneumoniae</i>	промоторная область	BRACO-19	подавление роста [65]
<i>S. enterica</i>	промоторная область, ген	BRACO-19 и 9-аминоакридин	подавление роста [63]
<i>S. pneumoniae</i>	гены	ТМРyP4	нет данных [64]
<i>V. cholerae</i>	гены	ТМРyP4	нет данных [81]

BRACO-19 на квадруплексы, и продемонстрировано ингибирующее действие непосредственно на рост бактерий [65]. Подавление роста также было показано в случае воздействия лигандов на *S. enterica* [63].

Исследование подавляющего эффекта G4-лигандов на *M. tuberculosis* представлено в нескольких публикациях. В одной из работ показан стабилизирующий эффект лигандов c-exNDI-2 и BRACO-19 на G4-формирующие последовательности, находящиеся в промоторах генов [80]. Также в работе было продемонстрировано ингибирующее действие соединений на рост бактерий, причём значение МИК80 для c-exNDI-2 и BRACO-19 составило 1,25 мкМ и 12,5 мкМ соответственно. Авторами подчеркивается, что ингибирующая концентрация BRACO-19 для микобактерий оказалась ниже, чем для эукариотических клеток, что также подтверждает возможность использования G4-лигандов в качестве новых антибактериальных агентов. В другой работе продемонстрирован ингибирующий эффект G4-лиганда ТМРyP4, а также его стабилизирующее действие на квадруплексы в генах, ассоциированных с вирулентностью [58]. На культуре клеток методом ПЦР в реальном времени также было показано уменьшение экспрессии целевых генов под действием этого соединения.

Следует отметить, что приведенные выше исследования рассматривали влияние G4-лигандов на ограниченное количество бактериальных G4-формирующих последовательностей. При этом наличие G4 в гене (в случае *M. tuberculosis* [58]) или промоторной области (*K. pneumoniae* [65]) всегда приводило к снижению экспрессии соответствующего гена под действием G4-лиганда.

В свою очередь, в работе нашей лаборатории был проанализирован транскриптомный ответ модельного микроорганизма *Mycobacterium smegmatis* MC² 155 в ходе воздействия соединений ТМРyP4 и BRACO-19 [82]. Суммарно в геноме *M. smegmatis* было идентифицировано 53 PQS в межгенных областях, 17 из которых располагались в промоторах генов, 267 PQS в кодирующей цепи и 398 PQS в антисмысловой цепи ДНК. Анализ результатов РНК-секвенирования обнаружил, что под действием ингибирующих концентраций BRACO-19 и ТМРyP4 изменяется экспрессия 822 (515↑; 307↓) и 680 (339↑; 341↓) генов соответственно, однако статистической связи между дифференциально экспрессирующимися генами и наличием PQS найдено не было (рис. 4). Между тем, для лиганда BRACO-19 мы обнаружили

значительные изменения в генах системы репликации и репарации, а также в генах метаболизма железа, что, несомненно, свидетельствует об индуцированном стрессе. Для соединения ТМРyP4 существенные изменения были обнаружены в экспрессии генов транскрипционных факторов и системы биосинтеза аргинина, что может указывать на множественные биологические мишени для этого соединения.

Необходимо подчеркнуть, что механизм влияния стабилизации G4 на экспрессию до конца не изучен, но, несомненно, не ограничивается её ингибированием, как первоначально предполагалось. Сравнительно недавно было показано, что данные структуры могут при определенных условиях как снижать, так и увеличивать уровень экспрессии путём изменения архитектуры хроматина [83]. У бактерий также наблюдается подобное явление, но оно обусловлено, по-видимому, иными механизмами. Так, производные нафталин диимида, способные к стабилизации квадруплекса, могут, наряду с ингибированием экспрессии у грамотрицательных микроорганизмов, усиливать её у грамположительных [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Квадруплексные структуры играют важную роль в таких фундаментальных процессах, как контроль транскрипции, трансляции и репарации ДНК как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. В последние десятилетия исследован механизм образования данных структур, их функциональная роль и регуляция. Однако наиболее подробно G4 изучены у эукариот. Несмотря на то, что G-квадруплексы у бактерий исследованы менее подробно, достигнутые результаты свидетельствуют о наличии у этих структур существенного потенциала в качестве мишеней для лекарств, обладающих принципиально новым механизмом действия. В настоящее время работы ведутся по нескольким направлениям — разработка новых инструментов для поиска в геномах последовательностей, потенциально способных к формированию квадруплексов, изучение их роли как факторов патогенности, перспективы их использования в лекарственной терапии инфекционных заболеваний и т.д. В данном обзоре были рассмотрены основные аспекты, касающиеся образования, регуляции и функциональной роли квадруплексов в бактериальных геномах, но исследования в данной области ещё далеки

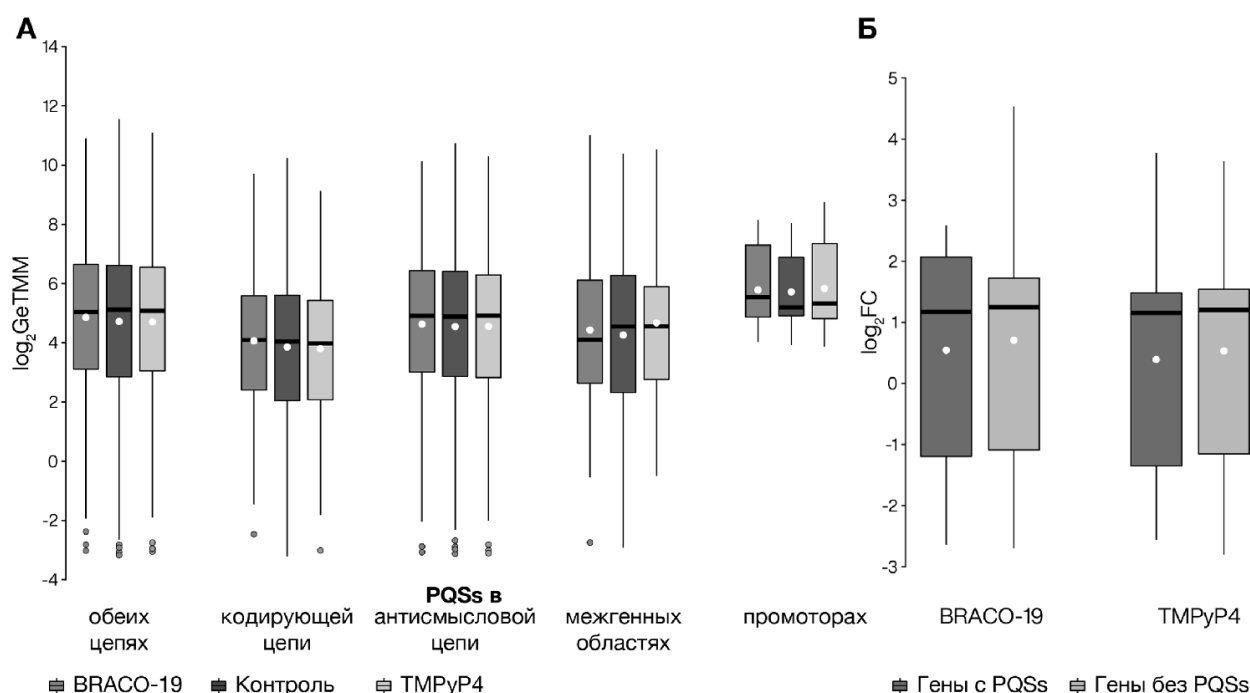


Рисунок 4. Различия в уровнях экспрессии генов, содержащих PQSs, между контрольными и обработанными лигандами образцами. **А** — диаграммы размаха, показывающие различия в нормализованных уровнях экспрессии генов, связанных с PQS, между контролем (чёрный), при воздействии BRACO-19 (тёмно-серый) и при воздействии TMPyP4 (светло-серый). **Б** — диаграммы размаха, показывающие изменение экспрессии ($\log_2 \text{FC}$) генов, односторонне регулируемых обоими соединениями ($n=191$). В ящике показаны верхний и нижний квартили, линия внутри показывает медиану. Белая точка указывает среднее значение. Точки над усами показывают выбросы. Двусторонний критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой на непрерывность использовался для расчёта значений p . Во всех сравнениях значение $p \gg 0,05$. Модифицировано из [82].

от завершения. Последние данные свидетельствуют, что роль G4 в регуляции значительно сложнее, чем представлялось ранее, в частности, они могут являться как ингибиторами, так и активаторами транскрипции [83]. Достаточно слабо изучены РНК-квадруплексы бактерий, тем не менее имеются свидетельства об их участии в регуляции биологически значимых процессов. Разработка новых методов обнаружения и подтверждения квадруплексных структур в будущем обеспечит значительный прогресс как в понимании роли отдельных G4 в регуляции генов, так и в области взаимодействия хозяин-микроорганизм.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №19-75-10109).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Watson J.D., Crick F.H. (1953) The structure of DNA. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **18**, 123-131. DOI: 10.1101/sqb.1953.018.01.020
2. Kaushik M., Kaushik S., Roy K., Singh A., Mahendru S., Kumar M., Chaudhary S., Ahmed S., Kukreti S. (2016) A bouquet of DNA structures: emerging diversity. Biochem. Biophys. Rep., **5**, 388-395. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.01.013
3. Gellert M., Lipsett M.N., Davies D.R. (1962) Helix formation by guanylic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **48**(12), 2013-2018. DOI: 10.1073/pnas.48.12.2013
4. Lipps H.J., Rhodes D. (2009) G-quadruplex structures: *in vivo* evidence and function. Trends Cell Biol., **19**(8), 414-422. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.05.002
5. Harkness R.W., Mittermaier A.K. (2017) G-quadruplex dynamics. Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics, **1865**(11 Pt B), 1544-1554. DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.06.012
6. Qin Y., Hurley L.H. (2008) Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions. Biochimie, **90**(8), 1149-1171. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.02.020
7. Yang D., Okamoto K. (2010) Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. Future Medicinal Chemistry, **2**(4), 619-646. DOI: 10.4155/fmc.09.172
8. Phan A.T., Kuryavyi V., Patel D.J. (2006) DNA architecture: from G to Z. Curr. Opin. Struct. Biol., **16**(3), 288-298. DOI: 10.1016/j.sbi.2006.05.011

9. Maizels N. (2006) Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**(12), 1055-1059. DOI: 10.1038/nsmb1171
10. Morris M.J., Negishi Y., Pazsint C., Schonhoft J.D., Basu S. (2010) An RNA G-quadruplex is essential for cap-independent translation initiation in human VEGF IRES. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**(50), 17831-17839. DOI: 10.1021/ja106287x
11. Rouleau S., Glouzon J.P.S., Brumwell A., Bisailon M., Perreault J.P. (2017) 3' UTR G-quadruplexes regulate miRNA binding. *RNA*, **23**(8), 1172-1179. DOI: 10.1261/rna.060962.117
12. Subramanian M., Rage F., Tabet R., Flatter E., Mandel J.L., Moine H. (2011) G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep.*, **12**(7), 697-704. DOI: 10.1038/embor.2011.76
13. Dexheimer T.S., Sun D., Hurley L.H. (2006) Deconvoluting the structural and drug-recognition complexity of the G-quadruplex-forming region upstream of the bcl-2 P1 promoter. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(16), 5404-5415. DOI: 10.1021/ja0563861
14. Siddiqui-Jain A., Grand C.L., Bearss D.J., Hurley L.H. (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(18), 11593-11598. DOI: 10.1073/pnas.182256799
15. Fernando H., Reszka A.P., Huppert J., Ladame S., Rankin S., Venkataraman A.R., Neidle S., Balasubramanian S. (2006) A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene. *Biochemistry*, **45**(25), 7854-7860. DOI: 10.1021/bi0601510
16. Palumbo S.L., Memmott R.M., Uribe D.J., Krotova-Khan Y., Hurley L.H., Ebbinghaus S.W. (2008) A novel G-quadruplex-forming GGA repeat region in the c-myc promoter is a critical regulator of promoter activity. *Nucleic Acids Res.*, **36**(6), 1755-1769. DOI: 10.1093/nar/gkm1069
17. Sun D., Guo K., Rusche J.J., Hurley L.H. (2005) Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents. *Nucleic Acids Res.*, **33**(18), 6070-6080. DOI: 10.1093/nar/gki917
18. Cogoi S., Paramasivam M., Filichev V., Géci I., Pedersen E.B., Xodo L.E. (2009) Identification of a new G-quadruplex motif in the KRAS promoter and design of pyrene-modified G4-decoys with antiproliferative activity in pancreatic cancer cells. *J. Med. Chem.*, **52**(2), 564-568. DOI: 10.1021/jm800874t
19. Agarwal T., Roy S., Kumar S., Chakraborty T.K., Maiti S. (2014) In the sense of transcription regulation by G-quadruplexes: asymmetric effects in sense and antisense strands. *Biochemistry*, **53**(23), 3711-3718. DOI: 10.1021/bi401451q
20. Rhodes D., Lipps H.J. (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.*, **43**(18), 8627-8637. DOI: 10.1093/nar/gkv862
21. Rawal P., Kummarsetti V.B.R., Ravindran J., Kumar N., Halder K., Sharma R., Mukerji M., Das S.K., Chowdhury S. (2006) Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: role in *Escherichia coli* global regulation. *Genome Res.*, **16**(5), 644-655. DOI: 10.1101/gr.4508806
22. Ravichandran S., Kim Y.E., Bansal V., Ghosh A., Hur J., Subramani V.K., Pradhan S., Lee M.K., Kim K.K., Ahn J.H. (2018) Genome-wide analysis of regulatory G-quadruplexes affecting gene expression in human cytomegalovirus. *PLoS Pathogens*, **14**(9). DOI: 10.1371/journal.ppat.1007334
23. Mishra S., Kota S., Chaudhary R., Misra H.S. (2021) Guanine quadruplexes and their roles in molecular processes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **56**(5), 482-499. DOI: 10.1080/10409238.2021.1926417
24. Saranathan N., Vivekanandan P. (2019) G-Quadruplexes: more than just a kink in microbial genomes. *Trends Microbiol.*, **27**(2), 148. DOI: 10.1016/j.tim.2018.08.011
25. Beaume N., Pathak R., Yadav V.K., Kota S., Misra H.S., Gautam H.K., Chowdhury S. (2013) Genome-wide study predicts promoter-G4 DNA motifs regulate selective functions in bacteria: radioresistance of *D. radiodurans* involves G4 DNA-mediated regulation. *Nucleic Acids Res.*, **41**(1), 76-89. DOI: 10.1093/nar/gks1071
26. Cahoon L.A., Seifert H.S. (2013) Transcription of a cis-acting, noncoding, small RNA is required for pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS Pathogens*, **9**(1), e1003074. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003074
27. Andreeva D.V., Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E. (2021) Ligands of G-quadruplex nucleic acids. *Russ. Chem. Rev.*, **90**(1), 1-38. DOI: 10.1070/rcr4968
28. Santos T., Salgado G.F., Cabrita E.J., Cruz C. (2021) G-quadruplexes and their ligands: biophysical methods to unravel G-quadruplex/ligand interactions. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **14**(8), 769. DOI: 10.3390/ph14080769
29. Balasubramanian S., Neidle S. (2009) G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**(3), 345-353. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.04.637
30. Ruggiero E., Richter S.N. (2018) G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Res.*, **46**(7), 3270-3283. DOI: 10.1093/nar/gky187
31. Chen B.J., Wu Y.L., Tanaka Y., Zhang W. (2014) Small molecules targeting c-Myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *Int. J. Biol. Sci.*, **10**(10), 1084-1096. DOI: 10.7150/ijbs.10190
32. Li F., Mulyana Y., Feterl M., Warner J.M., Collins J.G., Keene F.R. (2011) The antimicrobial activity of inert oligonuclear polypyridylruthenium(II) complexes against pathogenic bacteria, including MRSA. *Dalton Transactions*, **40**(18), 5032-5038. DOI: 10.1039/c1dt10250h
33. Selvam S., Koirala D., Yu Z., Mao H. (2014) Quantification of topological coupling between DNA superhelicity and G-quadruplex formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**(40), 13967-13970. DOI: 10.1021/ja5064394
34. Huppert J.L., Balasubramanian S. (2005) Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.*, **33**(9), 2908-2916. DOI: 10.1093/nar/gki609
35. Scaria V., Hariharan M., Arora A., Maiti S. (2006) Quadfinder: server for identification and analysis of quadruplex-forming motifs in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.*, **34**(suppl_2), W683-W685. DOI: 10.1093/nar/gkl299
36. Kikin O., d'Antonio L., Bagga P.S. (2006) QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.*, **34**(suppl_2), W676-W682. DOI: 10.1093/nar/gkl253
37. Dhapola P., Chowdhury S. (2016) QuadBase2: web server for multiplexed guanine quadruplex mining and visualization. *Nucleic Acids Res.*, **44**(W1), W277-W283. DOI: 10.1093/nar/gkw425
38. Varizhuk A., Ischenko D., Tsvetkov V., Novikov R., Kulemin N., Kaluzhny D., Vlasenok M., Naumov V., Smirnov I., Pozmogova G. (2017) The expanding repertoire of G4 DNA structures. *Biochimie*, **135**, 54-62. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.01.003
39. Hon J., Martínek T., Zendulka J., Lexa M. (2017) pqsfinder: an exhaustive and imperfection-tolerant search tool for

- potential quadruplex-forming sequences in R. Bioinformatics, **33**(21), 3373-3379. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx413
40. Eddy J., Maizels N. (2006) Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. Nucleic Acids Res., **34**(14), 3887-3896. DOI: 10.1093/nar/gkl529
41. Bedrat A., Lacroix L., Mergny J.L. (2016) Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. Nucleic Acids Res., **44**(4), 1746-1759. DOI: 10.1093/nar/gkw006
42. Beaudoin J.D., Jodoin R., Perreault J.P. (2014) New scoring system to identify RNA G-quadruplex folding. Nucleic Acids Res., **42**(2), 1209-1223. DOI: 10.1093/nar/gkt904
43. Belmonte-Reche E., Morales J.C. (2020) G4-iM Grinder: when size and frequency matter. G-Quadruplex, i-Motif and higher order structure search and analysis tool. NAR Genomics and Bioinformatics, **2**(1), lqz005. DOI: 10.1093/nargab/lqz005
44. Cebrían R., Belmonte-Reche E., Pirota V., de Jong A., Morales J.C., Freccero M., Doria F., Kuipers O.P. (2021) G-quadruplex DNA as a target in pathogenic bacteria: efficacy of an extended naphthalene diimide ligand and its mode of action. J. Med. Chem., **65**(6), 4752-4766. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01905
45. Bartas M., Cutová M., Brázda V., Kaura P., Štátný J., Kolomazník J., Coufal J., Goswami P., Červeň J., Pečinka P. (2019) The presence and localization of G-quadruplex forming sequences in the domain of bacteria. Molecules, **24**(9), 1711. DOI: 10.3390/molecules24091711
46. Wu F., Niu K., Cui Y., Li C., Lyu M., Ren Y., Chen Y., Deng H., Huang L., Zheng S., Liu L., Wang J., Song Q., Xiang H., Feng Q. (2021) Genome-wide analysis of DNA G-quadruplex motifs across 37 species provides insights into G4 evolution. Communications Biology, **4**(1), 1-11. DOI: 10.1038/s42003-020-01643-4
47. Giacani L., Brandt S.L., Puray-Chavez M., Reid T.B., Godornes C., Molini B.J., Benzler M., Hartig J.S., Lukehart S.A., Centurion-Lara A. (2012) Comparative investigation of the genomic regions involved in antigenic variation of the tprK antigen among treponemal species, subspecies, and strains. J. Bacteriol., **194**(16), 4208-4225. DOI: 10.1128/jb.00863-12
48. Guo J.U., Bartel D.P. (2016) RNA G-quadruplexes are globally unfolded in eukaryotic cells and depleted in bacteria. Science, **353**(6306), aaf5371. DOI: 10.1126/science.aaf5371
49. Shao X., Zhang W., Umar M.I., Wong H.Y., Seng Z., Xie Y., Zhang Y., Yang L., Kwok C.K., Deng X. (2020) RNA G-Quadruplex structures mediate gene regulation in bacteria. mBio, **11**(1), e02926-19. DOI: 10.1128/mbio.02926-19
50. Martinez-Antonio A., Collado-Vides J. (2003) Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. Curr. Opin. Microbiol., **6**(5), 482-489. DOI: 10.1016/j.mib.2003.09.002
51. Rui S., Tse-Dinh Y.C. (2003) Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. Front. Biosci., **8**, D256-D263. DOI: 10.2741/984
52. Huo Y.X., Rosenthal A.Z., Gralla J.D. (2008) General stress response signalling: unwrapping transcription complexes by DNA relaxation via the sigma38 C-terminal. Mol. Microbiol., **70**(2), 369-378. DOI: 10.1111/J.1365-2958.2008.06412.x
53. Yadav P., Kim N., Kumari M., Verma S., Sharma T.K., Yadav V., Kumar A. (2021) G-quadruplex structures in bacteria: biological relevance and potential as an antimicrobial target. J. Bacteriol., **203**(13), e0057720. DOI: 10.1128/jb.00577-20
54. Kumari N., Vartak S.V., Dahal S., Kumari S., Desai S.S., Gopalakrishnan V., Choudhary B., Raghavan S.C. (2019) G-quadruplex structures contribute to differential radiosensitivity of the human genome. iScience, **21**, 288-307. DOI: 10.1016/j.isci.2019.10.033
55. Lim S., Yoon H., Ryu S., Jung J., Lee M., Kim D. (2006) A comparative evaluation of radiation-induced DNA damage using real-time PCR: influence of base composition. Radiation Res., **165**(4), 430-437. DOI: 10.1667/rr3507.1
56. Ghosal D., Omelchenko M.V., Gaidamakova E.K., Matrosova V.Y., Vasilenko A., Venkateswaran A., Zhai M., Kostandarithes H.M., Brim H., Makarova K.S., Wackett L.P., Fredrickson J.K., Daly M.J. (2005) How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. FEMS Microbiol. Rev., **29**(2), 361-375. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.007
57. Al-Najjar M.A.A., Albokari M.M. (2019) Shifts in microbial community composition in tannery-contaminated soil in response to increased gamma radiation. Annals Microbiology, **69**(13), 1567-1577. DOI: 10.1007/s13213-019-01541-z
58. Mishra S.K., Shankar U., Jain N., Sikri K., Tyagi J.S., Sharma T.K., Mergny J.L., Kumar A. (2019) Characterization of G-quadruplex motifs in espB, espK, and cyp51 genes of *Mycobacterium tuberculosis* as potential drug targets. Molecular Therapy Nucleic Acids, **16**, 698-706. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.04.022
59. Agapov A.A., Kulbachinskiy A.V. (2015) Mechanisms of stress resistance and gene regulation in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Biochemistry (Moscow), **80**(10), 1201-1216. DOI: 10.1134/s0006297915100016
60. Cahoon L.A., Seifert H.S. (2009) An alternative DNA structure is necessary for pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. Science, **325**(5941), 764-767. DOI: 10.1126/science.1175653
61. Norris S.J. (2014) vls antigenic variation systems of Lyme disease *Borrelia*: eluding host immunity through both random, segmental gene conversion and framework heterogeneity. Microbiology Spectrum, **2**(6), DOI: 10.1128/microbiolspec.mdna3-0038-2014
62. Centurion-Lara A., LaFond R.E., Hevner K., Godornes C., Molini B.J., van Voorhis W.C., Lukehart S.A. (2004) Gene conversion: a mechanism for generation of heterogeneity in the tprK gene of *Treponema pallidum* during infection. Mol. Microbiol., **52**(6), 1579-1596. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04086.x
63. Jain N., Mishra S.K., Shankar U., Jaiswal A., Sharma T.K., Kodgire P., Kumar A. (2020) G-quadruplex stabilization in the ions and maltose transporters gene inhibit *Salmonella enterica* growth and virulence. Genomics, **112**(6), 4863. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.09.010
64. Mishra S.K., Jain N., Shankar U., Tawani A., Sharma T.K., Kumar A. (2019) Characterization of highly conserved G-quadruplex motifs as potential drug targets in *Streptococcus pneumoniae*. Sci. Rep., **9**(1), 1791. DOI: 10.1038/s41598-018-38400-x
65. Shankar U., Jain N., Mishra S.K., Sharma T.K., Kumar A. (2020) Conserved G-quadruplex motifs in gene promoter region reveals a novel therapeutic approach to target multi-drug resistance *Klebsiella pneumoniae*. Front. Microbiol., **11**, 1269. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01269/full
66. Gates A.J., Luque-Almagro V.M., Goddard A.D., Ferguson S.J., Roldan M.D., Richardson D.J. (2011) A composite biochemical system for bacterial nitrate and nitrite assimilation as exemplified by *Paracoccus denitrificans*. Biochem. J., **435**(3), 743-753. DOI: 10.1042/bj20101920

67. Yadav P., Harcy V., Argueso J.L., Dominska M., Jinks-Robertson S., Kim N. (2014) Topoisomerase I plays a critical role in suppressing genome instability at a highly transcribed G-quadruplex-forming sequence. *PLOS Genetics*, **10**(12), e1004839. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004839
68. Arimondo P.B., Riou J.F., Mergny J.L., Tazi J., Sun J.S., Garestier T., Hélène C. (2000) Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures. *Nucleic Acids Res.*, **28**(24), 4832-4838. DOI: 10.1093/nar/28.24.4832
69. Gray L.T., Vallur A.C., Eddy J., Maizels N. (2014) G quadruplexes are genomewide targets of transcriptional helicases XPB and XPD. *Nature Chem. Biol.*, **10**(4), 313-318. DOI: 10.1038/nchembio.1475
70. Maizels N., Gray L.T. (2013) The G4 Genome. *PLOS Genetics*, **9**(4), e1003468. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003468
71. Estep K.N., Butler T.J., Ding J., Brosh R.M. (2017) G4-interacting DNA helicases and polymerases: potential therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.*, **26**(16), 2881-2897. DOI: 10.2174/0929867324666171116123345
72. Cheung I., Schertzer M., Rose A., Lansdorp P.M. (2002) Disruption of dog-1 in *Caenorhabditis elegans* triggers deletions upstream of guanine-rich DNA. *Nature Genetics*, **31**(4), 405-409. DOI: 10.1038/ng928
73. Kota S., Misra H.S. (2015) Topoisomerase IB of *Deinococcus radiodurans* resolves guanine quadruplex DNA structures *in vitro*. *J. Biosci.*, **40**(5), 833-843. DOI: 10.1007/s12038-015-9571-z
74. Wu X., Maizels N. (2001) Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Res.*, **29**(8), 1765-1771. DOI: 10.1093/nar/29.8.1765
75. Shukla K., Thakur R.S., Ganguli D., Rao D.N., Nagaraju G. (2017) *Escherichia coli* and *Neisseria gonorrhoeae* UvrD helicase unwinds G4 DNA structures. *Biochem. J.*, **474**(21), 3579-3597. DOI: 10.1042/bcj20170587
76. Paul T., Voter A.F., Cueny R.R., Gavrilov M., Ha T., Keck J.L., Myong S. (2020) E. coli Rep helicase and RecA recombinase unwind G4 DNA and are important for resistance to G4-stabilizing ligands. *Nucleic Acids Res.*, **48**(12), 6640-6653. DOI: 10.1093/nar/gkaa442
77. Saha T., Shukla K., Thakur R.S., Desingu A., Nagaraju G. (2019) *Mycobacterium tuberculosis* UvrD1 and UvrD2 helicases unwind G-quadruplex DNA. *FEBS J.*, **286**(11), 2062-2086. DOI: 10.1111/febs.14798
78. Thakur R.S., Desingu A., Basavaraju S., Subramanya S., Rao D.N., Nagaraju G. (2014) *Mycobacterium tuberculosis* DinG Is a structure-specific helicase that unwinds G4 DNA: implications for targeting G4 DNA as a novel therapeutic approach. *J. Biol. Chem.*, **289**(36), 25112-25136. DOI: 10.1074/jbc.m114.563569
79. Waller Z.A.E., Pinchbeck B.J., Buguth B.S., Meadows T.G., Richardson D.J., Gates A.J. (2016) Control of bacterial nitrate assimilation by stabilization of G-quadruplex DNA. *Chemical Communications*, **52**(92), 13511. DOI: 10.1039/c6cc06057a
80. Perrone R., Lavezzo E., Riello E., Manganelli R., Palù G., Toppo S., Provvedi R., Richter S.N. (2017) Mapping and characterization of G-quadruplexes in *Mycobacterium tuberculosis* gene promoter regions. *Sci. Rep.*, **7**(1), 5743. DOI: 10.1038/s41598-017-05867-z
81. Shankar U., Jain N., Majee P., Kodgire P., Sharma T.K., Kumar A. (2020) Exploring computational and biophysical tools to study the presence of G-quadruplex structures: a promising therapeutic solution for drug-resistant *Vibrio cholerae*. *Front. Genetics*, **11**, 935. DOI: 10.3389/fgene.2020.00935
82. Shitikov E., Bespiatykh D., Malakhova M., Bespyatykh J., Bodoev I., Vedekhina T., Zaychikova M., Veselovsky V., Klimina K., Ilina E., Varizhuk A. (2022) Genome-wide transcriptional response of *Mycobacterium smegmatis* MC2155 to G-quadruplex ligands BRACO-19 and TMPyP4. *Front. Microbiol.*, **13**, 817024. DOI: 10.3389/fmicb.2022.817024
83. Robinson J., Raguseo F., Nuccio S.P., Liano D., di Antonio M. (2021) DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Res.*, **49**(15), 8419-8431. DOI: 10.1093/nar/gkab609

Поступила в редакцию: 14. 03. 2022.
После доработки: 08. 04. 2022.
Принята к печати: 12. 04. 2022.

G-QUADRUPLEX STRUCTURES IN BACTERIA: FUNCTIONAL PROPERTIES AND PROSPECTS FOR USE AS BIOTARGETS

E.A. Shitikov, D.A. Bespiatykh, I.N. Bodoev, M.V. Zaychikova*

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: eshitikov@mail.ru

G-quadruplexes (G4), non-canonical secondary DNA structures, are intensively investigated for a long time. In eukaryotic organisms they play an important role in the regulation of gene expression and DNA repair. G4 have also been found in the genomes of numerous bacteria and archaea, but their functional role has not yet been fully explored. Nevertheless, their participation in the formation of antigenic variability, pathogenicity, antibiotic resistance and survival in extreme conditions has been established. Currently, many tools have been developed to detect potential G4 sequences and confirm their formation ability. Since the controlled formation and resolution of the quadruplex are significant means for the regulation of genes critical for survival, a promising direction is the search for ligands — compounds that can have a stabilizing effect on the quadruplex structure and thereby alter gene expression. Currently, a number of ligands are already known, their use stops the growth of pathogenic microorganisms. G4 ligands are of interest as potential antibiotics, which are extremely relevant due to the wide spread of drug resistant pathogens.

Key words: quadruplexes; DNA secondary structure; antigenic variability; ligands; transcription regulation

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 19-75-10109).

Received 14.03.2022; revised 08.04.2022; accepted 12.04.2022.