Биомедицинская химия, 2016 том 62, вып. 5, с. 535-543.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.21: 577.29
©Коллектив авторов

КОНФОРМАЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ G-БОГАТЫХ ФРАГМЕНТОВ ALU-ПОВТОРОВ ДНК. I. НЕКАНОНИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ

А.В. Секридова, А.М. Варижук, О.Н. Татаринова, В.В. Северов, Н.А. Баринов, И.П. Смирнов, В.Н. Лазарев, Д.В. Клинов, Г.Е. Позмогова*

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а; тел.: +7(499)2464696; факс: +7(499)2464409;
эл. почта: pozmge@niifhm.ru

Впервые системно рассмотрен конформационный полиморфизм G-богатых фрагментов Alu-повторов ДНК (Alu). Ретротранспозоны Alu – короткие диспергированные повторы, широко представленные в геномах приматов. На примере последовательностей Alu-интрона проонкогена *bcl2* и консенсусного $AluS_x$ методом биоинформатического анализа определены характерные сайты (PQS), способные формировать G-квадруплексы (GQ). Показано, что в геноме человека они ассоциированы практически исключительно с Alu-повторами. Составлено представление о частотах встречаемости PQS_{Alu} (~1/10000 п.н.); установлено, что они наиболее характерны для молодых (активных) семейств AluY-повторов. Получены рекомбинантные последовательности Alu гена *bcl2* (304 п.н.) и мутант Alu-PQS. Методами DMS-футпринтинга и атомно-силовой микроскопии (АСМ) показана реализация неканонических структур в составе ДНК Alu_{bcl2} и их отсутствие в Alu-PQS. Получены экспрессионные векторы, несущие вставки природного и мутантного Alu в промоторной области репортерного гена, и сопоставлены их регуляторные эффекты при трансфекции культур клеток HEK293 и HeLa. Мы предполагаем, что изучение динамики пространственной организации Alu-повторов ДНК может внести вклад в понимание механизмов геномных перестроек, лежащих в основе многих онкологических и нейродегенеративных патологий.

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

DOI 10.18097/PBMC20166205535

ВВЕДЕНИЕ

Alu-повторы (Alu, ~300 п.н.), составляющие более 10% генома человека, рассматриваются сегодня как важные элементы тонкой регуляторной настройки. Короткие диспергированные повторы (SINE – Short Interspersed Repeated Sequences), к которым относятся Alu, участвуют, например, в механизмах регуляции экспрессии генов антисмысловыми и микроРНК [1-2]. Предполагают, что широкое распространение ретротранспозонов (в первую очередь, Alu) в геномах приматов могло привести к появлению нового уровня регуляции.

Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей представителей Alu-семейств, а также геномных перестроек, связанных с делециями и вставками Alu, особенно важен для молекулярной медицины, поскольку известно, что они могут приводить к развитию широкого ряда патологий [3-6].

В то же время, ключевым подходом, позволившим понять механизмы некоторых заболеваний, оказалось исследование динамики вторичных структур полинуклеотидов, то есть их конформационного полиморфизма. Примером значимости пространственной организации Alu РНК могут служить процессы A-I-редактирования, основанные на взаимодействии РНК-дуплексов (в подавляющем числе случаев образованных инвертированными Alu или их фрагментами) с аденозиндезаминазой ADAR. Снижение уровня A-I-редактирования наблюдается, например, при боковом амиотрофическом склерозе, эпилепсии, онкологических заболеваниях, главным образом, глиобластомах [7-11]. Динамику вторичных структур Alu ДНК подробно не изучали.

Мы предполагаем, что G-богатые фрагменты Alu ДНК обладают конформационным потенциалом, и их свойства представляют интерес для понимания процессов геномной регуляции, транслокации и рекомбинации. Внимание к этим сайтам связано, в первую очередь, с участием PQS (Potential G-Quadruplex Site) в хромосомных перестройках [12-15]. Кроме того, недавно показано, что Alu обогащены мотивами, чувствительными к двунитевым разрывам (DB) ДНК [4]. DB могут приводить к развитию геномных аномалий и вариаций, CNV (Copy Number Variations) – известной причины нейродегенеративных, онкологических и др. заболеваний [16]. Предполагают [4], что ключевая роль в механизмах CNV принадлежит вторичным неканоническим структурам ДНК, которые, возможно, формируются в характерных для DB-мотивов G-богатых тандемах.

Задача настоящей работы состояла в изучении конформационного полиморфизма G-богатых фрагментов Alu ДНК для анализа возможной роли неканонических ДНК-структур в механизмах биологических процессов.

Мы изучали природный Alu-фрагмент интрона проонкогена *bcl2* (18 chr.h), гомологичный

* - адресат для переписки

консенсусной последовательности $AluS_x$ [6, 17]. Методами биоинформатического анализа определены Alu-PQS, составлено представление о частотах их встречаемости в геноме человека, принадлежности к различным Alu-семействам. Для сравнения регуляторных эффектов природного Alu и его PQS-мутанта получены рекомбинантные структуры и соответствующие экспрессионные векторы на основе плазмиды pEGFP-N1. Изменение уровня флуоресценции регистрировали после трансфекции этими векторами линий клеток HeLa и HEK293. Реализация неканонических структур в составе Alu-ампликонов подтверждена методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) и DMS-футпринтинга. Подробные физико-химические характеристики PQS-олигомеров, описанные во второй части статьи, позволили установить структуру PQS-олигомеров, показать формирование стабильных внутри- и межмолекулярных G-квадруплексов (GQ).

МЕТОДИКА

Синтез олигонуклеотидов проводили твёрдофазным амидофосфитным методом с использованием коммерческих реагентов (“Glen Research”, США) на синтезаторе ДНК ASM-800 (Биосет, РФ) как описано в [18]. Хроматографически очищенные по методу [19] олигонуклеотиды (>95%) характеризовали МАЛДИ МС (“Bruker Microflex”, США), как описано в [20].

Рекомбинантные Alu_{bcl2} и Alu-PQS получали химико-ферментативным методом с использованием синтетических олигонуклеотидов (Alu1-10, Alu2m, Alu4m, Alu7m и Alu9m, таблица).

Экспрессионные плазмидные векторы получены на основе коммерческой плазмиды pEGFP-N1 (“Clontech”, США), ПЦР-продукты клонировали в вектор pGEM-TEasy (“Promega”, США).

Таблица. Последовательности рекомбинантных Alu и синтетических олигонуклеотидов

Наименование	Последовательность 5′-3′
Alu_{bcl2}	GGCCCCGCACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGACCA-CAGTTCAGGAGATTGAGACCATCTTGGTTAACACGGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAA-AAAATTTAGCTGGGGATGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTGCTTGGGAGGCTGAGGCAGG-AGAATGGCATGAACCCTGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCACGCCACTGCACTCCAG-CCTGGGCGACACAGCGAAACTCTGTCTC; 63296930-63297212 Homo sapiens chromosome 18, GRCh38 reference primary assembly. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Alu-PQS	GGCCCCGCACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGtCtGGCGGACCAC-GAGTTCAGGAGATTGAGACCATCTTGGTTAACACGGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAA-AAAATTTAGCTGGGGATGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTGCTTGGGAGGCTGAttCAGGA-GAATGGCATGAACCCTttAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCACGCCACTGCACTCCAGCC-TGGGCGACACAGCGAAACTCTGTCTC*
Alu1	GGCCCCGCACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG
Alu2	GAGGCCGAGGCGGGCGGACCACGAGTTCAGGAGATTGAGACCATCTTGGTTAACACG
Alu3	GTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTTAGCTGGGGATGGTGGCGGGCGCCTGT
Alu4	AGTCCCAGCTGCTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCATGAACCCTGGAGGCGGA
Alu5	GGTTGCAGTGAGCCAAGATCACGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACACAGCGAAACTCTGTCTC
Alu6	CTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGTGCGGGGCC
Alu7	AGGGTTTCACCGTGTTAACCAAGATGGTCTCAATCTCCTGAACTCGTGGTCCGCCCGC
Alu8	AGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACCATCCCCAGCTAAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGAC
Alu9	CACTGCAACCTCCGCCTCCAGGGTTCATGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGC
Alu10	GAGACAGAGTTTCGCTGTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGTGATCTTGGCT
Alu2m	GAGGCCGAGTCTGGCGGACCACGAGTTCAGGAGATTGAGACCATCTTGGTTAACACG
Alu4m	AGTCCCAGCTGCTTGGGAGGCTGATTCAGGAGAATGGCATGAACCCTTTAGGCGGA
Alu7m	AGGGTTTCACCGTGTTAACCAAGATGGTCTCAATCTCCTGAACTCGTGGTCCGCCAGA
Alu9m	CACTGCAACCTCCGCCTAAAGGGTTCATGCCATTCTCCTGAATCAGCCTCCCAAGC
PrF	CATATATTAATGGCCCCGCACGGTGG**
PrR	CTCGCATTAATGAGACAGAGTTTCGCTGTG**
DMS-PQS2	FAM-CCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGACCACGA
DMS-PQS3	FAM-CCAGCTGCTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCAT
DMS-PQS4	FAM-GCATGAACCCTGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAG
PQS2_compl	TCGTGGTCCGCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGG
PQS3_compl	ATGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGCAGCTGG
PQS4_compl	CTCACTGCAACCTCCGCCTCCAG-GGTTCATGC
ss-control	FAM AAGTGTGTGCGTGAGTGCGTGAGGCCAAGT

Примечание: * - прописными буквами обозначены мутации, препятствующие образованию GQ; ** - подчёркиванием обозначены сайты рестрикции AseI.

Рекомбинантные Alubcl2 и Alu-PQS амплифицировали с использованием праймеров PrF и PrR, подвергали рестрикции по сайтам AseI и лигировали с линейной плазмидой pGEM-TEasy. Далее смеси прогревали в течение 10 мин при 65°C и проводили трансформацию клеток *Escherichia col*i DH5A. Плазмиды выделяли из суспензии клеток, используя GeneJET Plasmid Midiprep Kit (“Fermentas”, США). Правильность последовательности вставки подтверждали секвенированием. Экспрессионные векторы на основе pGEM-TEasy подвергали рестрикции по сайту AseI. Фрагмент очищали и лигировали с линейным вектором pEGFP-N1 (сайт AseI). Уникальный сайт клонирования находился перед промоторной областью репортерного белка EGFP. В результате получены плазмидные векторы – pAluf, pAlu-PQSf, pAlur, pAlu-PQSr (f – прямая вставка, r – обратная вставка). Клетки линий HeLa (ATCC CCL-2) и HEK 293 (ATCC CRL-1573) культивировали в пластиковых культуральных флаконах (“Corning-Costar”, Нидерланды) в среде DMEM (“Sigma”, США), содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров, в атмосфере 5% CO_2 при 37°C. Клетки рассевали дважды в неделю с помощью раствора трипсин-ЭДТА (0,05% трипсин, 0,02% ЭДТА).

Трансфекцию клеток проводили с использованием реагента TransPass COS/293 (“NEB”, США), согласно инструкции фирмы-производителя. Плазмидную ДНК для трансфекции выделяли с использованием набора EndoFree Plasmid Maxi Kit (“Qiagen”, Германия).

Для каждой плазмиды в эксперименте использовали три повторности и два разведения. Уровень экспрессии репортерного белка оценивали по интенсивности флуоресценции зелёного флуоресцентного белка (GFP, 488 нм) с использованием проточного цитофлуориметра Coulter Epix XL (“Beckman Coulter”, США).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Ампликоны dsAlu и dsAlu-PQS получали с использованием плазмид pAlu и pAlu-PQS и праймеров PrF и PrR (таблица) в условиях стандартной ПЦР. Фрагменты ДНК после электрофоретического разделения в агарозном геле дополнительно очищали на картридже Performa® DTR DTR Gel Filtration Performa. Подготовленные образцы перед анализом разбавляли буфером (10 мМ KCl, 0,5 мМ Трис-HCl pH 7,5) в 100-2000 раз. В качестве подложек использовали свежесколотый высокоориентированный пиролитический графит. На его поверхность наносили 20 мкл 0,1% раствора-модификатора графита GM (“Нанотюнинг”, Россия), экспонировали во влажной камере в течение 10 мин, затем GM удаляли в струе сжатого азота и высушивали. Образец ДНК (1 мкл) наносили на поверхность подложки на 2-5 с, затем разбавляли 100 мкл воды, через 10 с жидкость сдували струей азота.

Рельеф образцов измеряли в полуконтактном резонансном режиме на исследовательском комплексе Интегра Прима (“NT-MDT”, Россия) 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 и углом при его вершине <22 (“Нанотюнинг”). Амплитуда свободных колебаний кантилевера в воздухе лежала в пределах 1-10 нм, автоматически поддерживаемая амплитуда в подведённом к поверхности состоянии (параметр SetPoint) устанавливалась на уровне 60-70% от неё. Обработку сигнала, перевод его в цифровой вид и формирование изображений проводили с помощью программного обеспечения NOVA 1.1 (“NT-MDT”). Обработку изображений и измерение высот визуализированных объектов проводили с помощью модуля обработки изображений NOVA Image Analysis 2.0.

Для полуавтоматического измерения длины олигонуклеотидов использовали программу DNA-calc [21]. Начало и конец каждого олигонуклеотида выбирали вручную, траекторию вдоль длины измеряли автоматически. Гистограммы распределения высот строили в MS Excel.

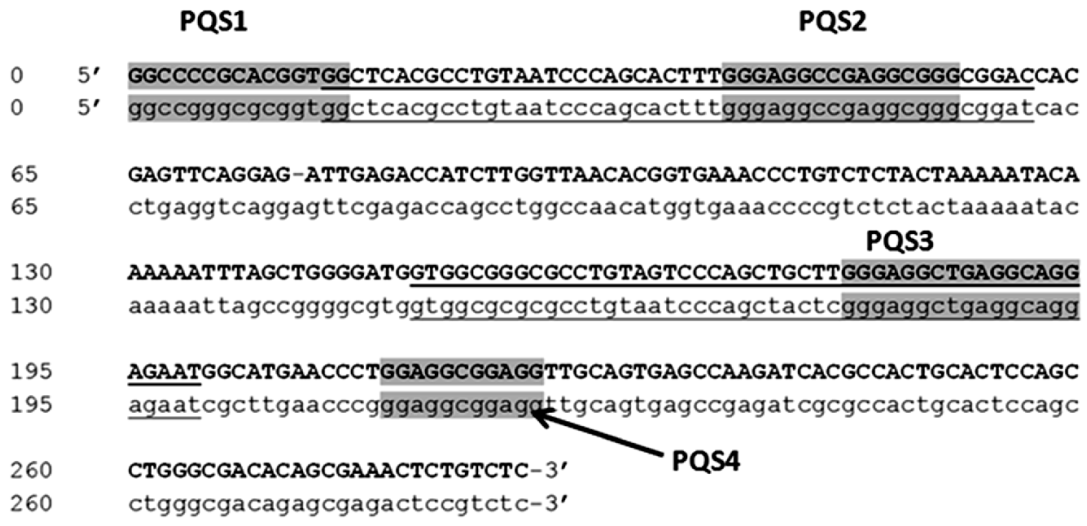
DMS-футпринтинг

Для проведения DMS-футпринтинга по методу [22] был синтезирован набор FAM-олигонуклеотидов, несущих PQS: DMS-PQS2, DMS-PQS3, DMS-PQS4 и комплементарные олигомеры: PQS2-compl, PQS3-compl и PQS4-compl, а также контрольный FAM-олигомер ss-control, не способный формировать вторичные структуры (таблица). Сравнивали интенсивности флуоресценции полос, образующихся при проведении реакции в 18% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии ионов калия (стабилизирует GQ) или лития (препятствует формированию GQ-конформации).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор последовательности Alu и анализ PQS

Ранее в результате подробного изучения разнообразия Alu была предложена консенсусная последовательность $AluS_x$ (Alu_{cons}) [6, 17], которая стала общепринятым и удобным объектом структурных исследований. Однако при изучении функциональных свойств Alu-сайтов необходимо, очевидно, рассматривать не усреднённый вариант, а природные фрагменты генома. Поэтому мы выбрали Alu-повтор интрона проонкогена *bcl2* (Alu_{bcl2}), несущий основные элементы Alu и высокогомологичный Alu_{cons} в G-богатых сайтах. Фланкирующий A-блок повтора в рассмотрение не включали, поскольку он не склонен к формированию неканонических структур, и известно, что он участвует в транслокации [6, 17]. Анализ последовательности с помощью программы поиска потенциальных GQ-сайтов ImGQ-finder (http://imgqfinder.niifhm.ru/) позволил выявить четыре консервативные группы частично перекрывающихся двухквартетных PQS-сайтов, характерных для Alu_{cons} и Alu_{bcl2} (рис. 1).



Последовательности PQS Alu

PQS1.1	ggccgggcgcggtgg	PQS2.1 PQS2.2 PQS2.3	GGGAGGCCGAGGCGG GGAGGCCGAGGCGG GGGAGGCCGAGGCGGG
PQS3.1 PQS3.2	GGGAGGCTGAGGCAGG GGAGGCTGAGGCAGG	PQS4.1 PQS4.2	GGAGGCGGAGG gggaggcggagg

Рисунок 1. Последовательности Alu-фрагмента интрона гена *bcl2*, Alu_{bcl2} (прописные буквы) и консенсусного повтора Alu_{cons} (строчные буквы). PQS-сайты отмечены серым фоном, а их последовательности без перекрывания приведены в таблице. Подчёркнуты DB-мотивы.

Представленность PQS в геноме и их распределение в семействах Alu

О функциональной роли выбранных сайтов известно, что фрагмент PQS1 является внутренним промотором РНК-полимеразы III (так называемый "B-бокс") [6, 17]. Сведения о свойствах PQS4 до настоящего времени не опубликованы.

Для изучения механизмов рекомбинации наибольший интерес представляют PQS2 и PQS3 – фрагменты DB-мотива. Они широко представлены в геноме человека и встречаются в среднем не менее 1 раза на 10000 п.н. Распределение PQS2, 3 и 4 по хромосомам носит общий характер (рис. 2А). Средняя частота встречаемости PQS2.1 составляет 2,2/100000 п.н., PQS3.1 – 9,2, а PQS4.1 – 3,9. Максимальные значения характерны для хромосом 17 и 19, они достигают в случае PQS3.1. 2,2/10 000 п.н. (19 хромосома), а минимальные – для Y-хромосомы (1 PQS2.1/100 000 п.н.).

Принадлежность выбранных PQS к Alu показана и на примере анализа выборки из ~24000 Alu-последовательностей, аннотированных NCBI в составе хромосомы 18 человека, в которой встречаемость PQS Alu была близкой к средней (рис. 2А). Все сайты ассоциированы практически исключительно с Alu (100% PQS2.1, 99,2% сайтов PQS3.1 и 98,2% PQS4.1).

Интересно отметить, что не для всех семейств Alu характерно присутствие PQS (например, PQS3.1, распространенного в геноме с наибольшей частотой). В рассматриваемой выборке Alu (хромосома 18) присутствуют представители различных семейств (рис. 2Б). На рисунке 2В приведены гистограммы частот встречаемости PQS3.1 в выборке и его представленность в каждом из семейств Alu. Этот PQS3.1 наиболее часто (в 85-100%) встречается в повторах семейств AluYb9, AluYa5, AluYb8, AluYg6. Во второй группе повторов (AluY, AluYd8, AluSp, AluSc, AluSq, AluSg, AluSx, AluSg/x) частота этой последовательности составляет от 15 до 49%. Третья группа объединяет семейства AluSp/q, AluJo, FAM, AluJb, AluSg1, FRAM, 7SLRNA, FLAM_A, AluJo/FLAM, FLAM_C, AluS, AluSq/x, AluJ/FLAM, в которых частота PQS3.1 не превышает 10%. Повторы, отнесённые к семействам Alu, AluJ, AluJ/FRAM, AluJ/monomer, AluJo/FRAM, AluYa, AluYa5/8, AluYb, AluYc, AluYd, AluYg, AluYh9, BC200, FLAM и FRAM/FAM, не содержат PQS3.1.

Последовательность PQS3.1, как видно из проведённого анализа, характерна для представителей старых (например, AluSx) и новых (например, AluY) семейств. Однако содержание PQS (29%) у основного представителя старых семейств Alu – AluSx, практически совпадает с долей AluSx в Alu-семействах хромосомы 18 (28%). У молодого семейства AluY, составляющего 12% всех Alu-повторов выборки, доля PQS достигает 27%.

Таким образом, присутствие PQS3.1 наиболее характерно для ряда молодых (активных) семейств, например, AluYb9, AluYa5, AluYb8, AluYg6, что косвенно свидетельствует о биологической значимости этого сайта.

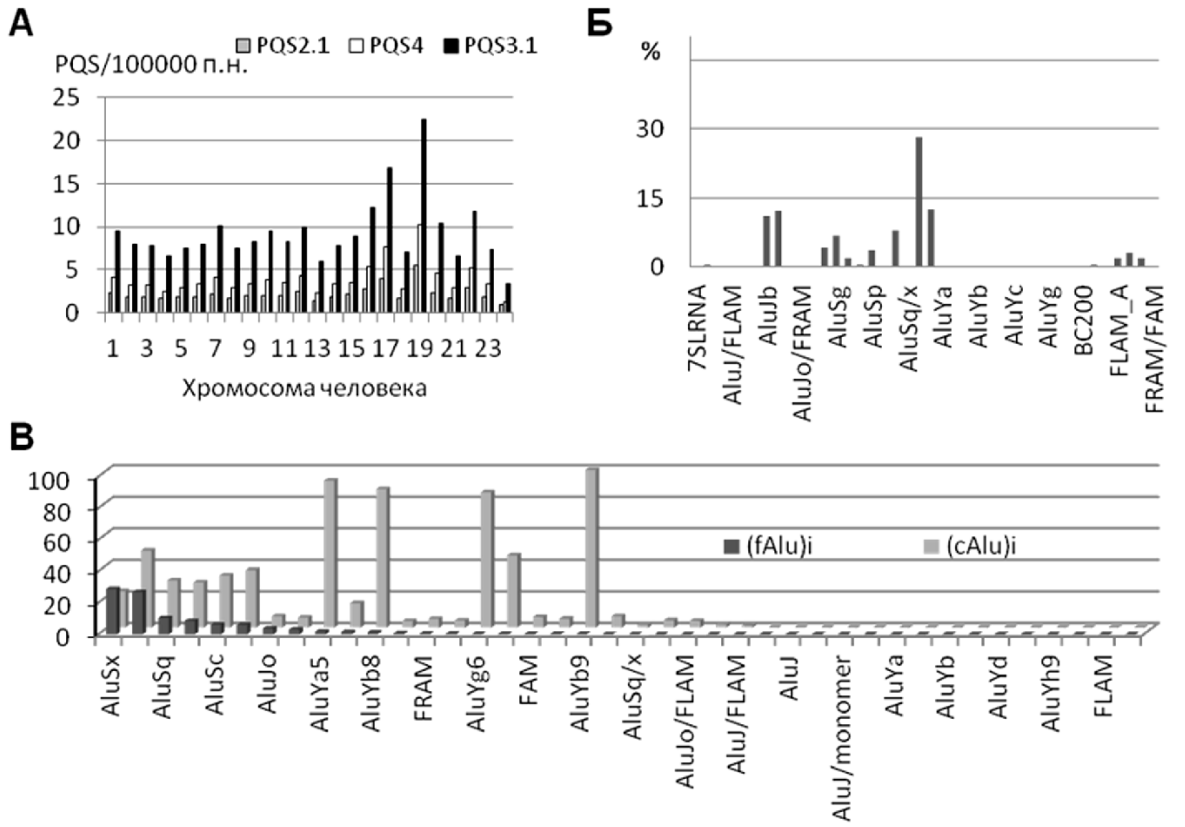


Рисунок 2. Представленность Alu-PQS в геноме и их распределение по семействам Alu. (А) Распределение PQS Alu по хромосомам генома человека. (Б) Распределение Alu-семейств в 18 хромосоме. (В) Частоты встречаемости (fAlu)i PQS олигонуклеотида PQS3.1 в выборке Alu-семейств18 хромосомы человека и представленность (cAlu)i PQS3.1 в каждом из них. Для анализа использовали данные NCBI (GRCh38 reference primary assembly.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/); fAlu для i-семейства Alu вычисляли как отношение числа PQS3.1 в i-семействе к общему числу PQS3.1 в выборке; cAlu - отношение числа PQS3.1 в i-семействе к количеству его представителей.

Влияние вставки рекомбинантных Alu_{bcl2} и Alu-PQS на экспрессию репортерного гена

Биологические функции Alu активно изучаются в настоящее время. Показано, что эти повторы участвуют в ответе на стресс, в регуляции процессов транслокации, рекомбинации и др. [23-26]. Описана способность расположенного перед промотором Alu усиливать экспрессию генов, причем независимо от ориентации и числа копий [27]. В настоящей работе получены рекомбинантные Alu-ДНК: Alu_{bcl2} и мутант по PQS (Alu-PQS). Химико-ферментативный синтез фрагментов (282 п.н.) осуществляли с использованием олигомеров, приведённых в таблице.

На основе коммерческой плазмиды pEGFP-N1 (“Clontech”, США) генно-инженерными методами получены экспрессионные векторы, несущие в промоторной области гена *GFP* вставки Alu в прямой (f) и обратной (r) ориентации (рис. 3А). В клетки HeLa и HEK293 плазмиды pAlu(f/r), pAlu-PQS(f/r) и pEGFP-N1(в качестве контроля) доставляли липофекцией.

Оказалось, что во всех вариантах Alu-вставка приводила к статистически значимому увеличению флуоресценции (на 30-40% в случае HeLa и 30-70% в клетках HEK293). То есть рассматриваемая нами последовательность Alu_{bcl2}, которая, как показано, несёт PQS, характерные для молодых семейств Alu, по регуляторным свойствам может служить адекватной моделью активного Alu-повтора.

Направление вставки, как и предполагалось согласно [27], не было существенным. Поэтому при сравнительном анализе эффекта Alu и Alu-PQS учитывали суммарные данные для плазмид f/r. Показано, что в эмбриональных клетках (HEK293) PQS-мутации приводили к небольшому снижению Alu-эффекта (на ~20%). Поскольку статистически значимых различий в действии Alu и Alu-PQS в опытах на культуре клеток HeLa выявить не удалось (рис. 3Б), можно предположить, что система регуляции раковых клеток оказалась нечувствительной к PQS-мутациям Alu.

Анализ возможности формирования GQ в составе протяжённых и дуплексных фрагментов $ДНК_{Alu}$

DMS-футпринтинг. Для доказательства формирования GQ в составе протяжённой последовательности и/или дуплекса используют весьма ограниченное число приемов. Отметим, что эффективность применения DMS-футпринтинга и метода, основанного на GQ-зависимой остановке элонгации при ПЦР, показана только для нескольких высокостабильных GQ [22, 28]. Применяемые

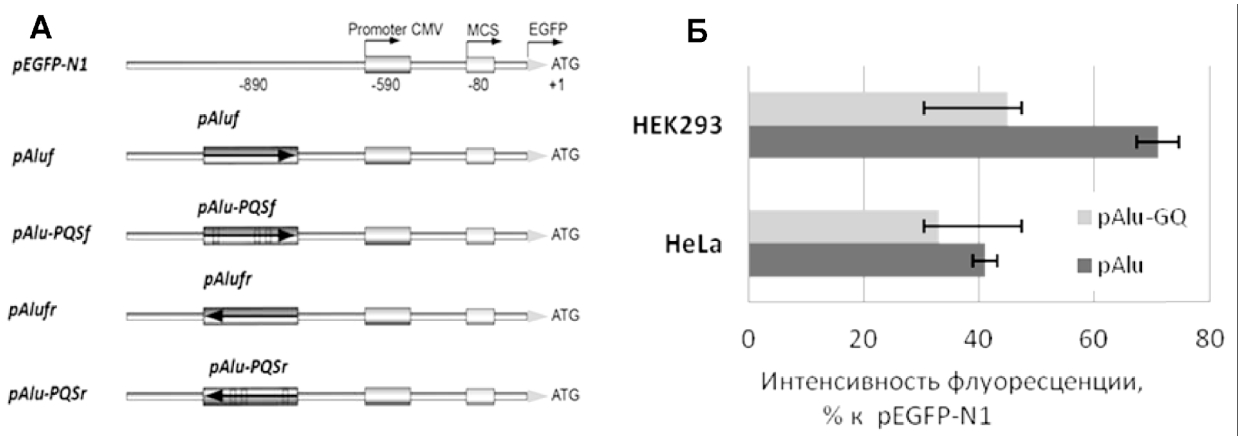


Рисунок 3. Влияние Alu_{bcl2} и Alu-PQS на экспрессию репортерного гена. (А) Схема строения рекомбинантных плазмид, несущих вставки Alu в промоторной области репортерного гена GFP. (Б) Сравнение уровней экспрессии GFP в культурах клеток HeLa и HEK293, трансфицированных pAlu, pAlu-PQS и pEGFP-N1 (контроль). Данные для прямых и обратных вставок суммированы. Флуоресценцию трансфицированных клеток измеряли методом проточной цитофлуореметрии при 488 нм.

для выявления GQ-сайтов аффинные взаимодействия с белками или низкомолекулярными лигандами [29-32], по-видимому, искажают исходное конформационное равновесие.

PQS-Alu теоретически способны формировать лишь двухквартетные GQ, эффективность DMS-футпринтинга в отношении которых не была ранее показана. Тем не менее, мы предприняли попытку зафиксировать снижение скорости метилирования DMS PQS-гуанинов (потенциально соединённых хугстиновскими водородными связями) в составе ss/ds (однонитевых/двунитевых, **s**ingle **s**tranded/**d**ouble **s**tranded) Alu-фрагментов в сравнении с гуанинами, не входящими в тетрады предполагаемых GQ. Для этого был синтезирован набор олигомеров и получены соответствующие дуплексы, в которых PQS-цепи (DMS-PQS2, DMS-PQS3 и DMS-PQS4, таблица) несли 5′-флуоресцентную метку.

На рисунке 4 приведены результаты ПААГ-анализа DMS-футпринтинга и гистограммы распределения относительной интенсивности (реакция в присутствии Li^+/K^+) флуоресценции фрагментов ss- и ds-олигомеров. Данные сканирования гелей нормировали по сигналам фрагментов, отмеченных на рисунке 4 (△).

В отличие от контроля (ss-control, правая панель на рис. 4), в котором не наблюдали K^+/Li^+-зависимости интенсивности полос (отклонение для фрагментов длиннее 8 нуклеотидов не превышало 3,5%), присутствие ионов калия заметно (20-60%) снижало уровень метилирования гуанинов в некоторых позициях PQS(2-4)-олигомеров (рис 4). Причём, в однонитевых олигомерах всегда присутствовали четыре группы G-блоков, состоящих из двух-трёх звеньев. Для DMS-PQS2 и DMS-PQS3 можно отметить отсутствие статистически значимой разницы в сигналах, обусловленных расщеплением G в позициях 32 и 33, следовательно, присутствие среди равновесных конформаций PQS GQ с включением этих G в тетрады маловероятно.

Уменьшение разницы между интенсивностями полос DMS-фрагментов олигомеров (Li^+-K^+) при метилировании G в составе ds-PQS2 и ds-PQS3 свидетельствует, вероятно, о смещении равновесия ‘неканоническая (non-B) форма ↔ дуплекс’ в сторону дуплексов. В то же время, сохранение общих черт в гистограммах ss- и ds-PQS4 может говорить о GQ-фолдинге этого сайта как в расплетённом состоянии ДНК (например, после разрыва), так и в составе дуплекса (см. гистограммы на рис. 4.).

Следует отметить, что полученные данные подтверждают предположение о возможности формирования G-квадруплексов в составе рассмотренных фрагментов Alu, хотя и не позволяют сделать однозначные выводы о структурах и топологии GQ. Можно предположить присутствие смеси конформеров PQS локусов ДНК, причём GQ-форма с большей вероятностью (для PQS2 и 3) реализуется после расплавления дуплекса, то есть при никировании или ds-разрывах, в процессе репликации, транскрипции или, возможно, в составе РНК.

Сравнительное исследование структуры ампликонов (304 п.н.) dsAlu и dsAlu-PQS методом АСМ. Применение для визуализации АСМ высокого разрешения позволило хорошо различать отдельные Alu ДНК-дуплексы (рис. 5А,Б), полученные ПЦР-амплификацией плазмид dsAlu и dsAlu-PQS (dsAlu, 304 п.н., праймеры PrF и PrR, таблица). Однако отличить GQ и изгиб dsДНК в рамках этого метода не всегда представляется возможным (рис. 5Б).

Надёжным показателем формирования non-B сайтов в составе ампликонов может служить изменение их длины в сравнении с ДНК-дуплексом [33]. Действительно, теоретически фолдинг GQ длиной 12-18 звеньев должен укоротить дуплекс на 3-5 нм.

Гистограммы распределения длин dsAlu и dsAlu-PQS приведены на рисунке 5В. Распределение длин мутантной dsAlu-PQS-ДНК представлено гауссианой с максимумом в области 100 нм (теоретически длина dsAlu-PQS равна 103,6 нм). Кривая распределения природной dsAlu содержит,

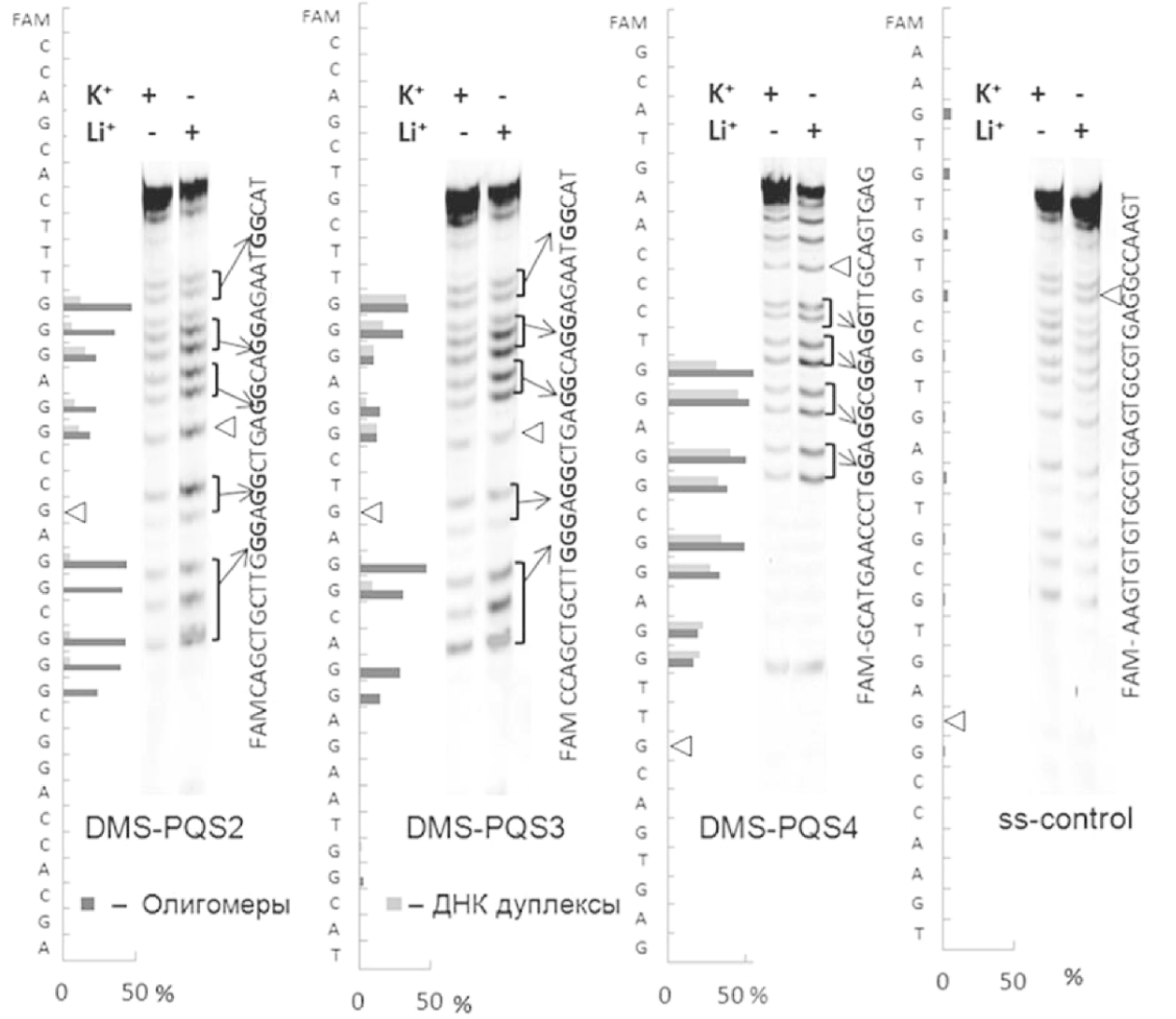


Рисунок 4. DMS-футпринтинг олигонуклеотидов DMS-PQS2, DMS-PQS3, DMS-PQS4 и ss-control (см. таблицу). Гистограммы относительной интенсивности флуоресценции фрагментов соответствуют разнице площадей пиков нормированных (по отмеченной △ позиции) профилей флуоресценции электрофореграмм олигомеров и их дуплексов после обработки диметилсульфатом в присутствии Li^+ и в среде K^+.

как минимум, два пика: основной в области 85-87 нм и дополнительный при ~100 нм. Длина дуплексов, соответствующих дополнительному пику, совпадает с длиной мутантного дуплекса, лишённого возможности формировать GQ, то есть в условиях анализа неканонические структуры в составе части молекул ампликона dsAlu отсутствуют. Разницу между длиной dsAlu мажорного пика и мутанта можно оценить в 13-15 нм. Статистически значимое укорочение ДНК надёжно свидетельствует о возможности формирования non-B структур в составе большей части молекул $dsAlu_{bcl2}$. Причём, исходя из размера, укорочения и структур PQS, наиболее вероятно образование трёх GQ в её составе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате анализа G-богатых фрагментов Alu-повтора интрона проонкогена *bcl2* и консенсусного $AluS_x$ [6, 17] были выбраны фрагменты (PQS), теоретически способные формировать GQ (рис. 1). Биоинформатическим анализом показана их принадлежность практически исключительно к Alu-повторам генома человека. Составлено представление о частотах встречаемости PQSAlu (~1/10000 п.н.); установлено, что они наиболее характерны для молодых (активных) семейств AluY-повторов.

В экспериментах с рекомбинантными плазмидами, несущими вставку Alu_{bcl2} или Alu-PQS (мутант) перед промотором гена *GFP*, подтверждена способность Alu-инсерций усиливать экспрессию репортерного белка. Отметим, что накопление флуоресценции не зависело от направления Alu-вставки, как и у генов *CYP11B1* и *CYP11B2*, вовлечённых в обмен стероидов [27]. Внесение мутаций (GG→TT), препятствующих сборке GQ, несколько снижало эффект, что говорит о возможном участии PQS не только в процессах транслокации, но и геномной регуляции.

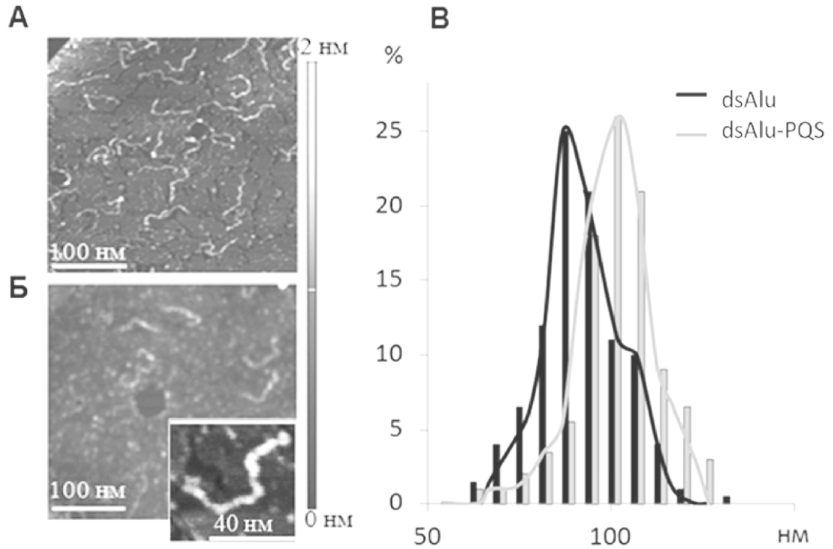


Рисунок 5. АСМ-анализ препаратов dsAlu-PQS (А) и dsAlu (Б) и распределение ампликонов по длине ДНК (В).

Методами DMS-футпринтинга и АСМ-анализа нам впервые удалось надежно показать возможность реализации non-B структур в составе однонитевых и дуплексных фрагментов Alu и ДНК Alu-повтора гена *bcl2* (304 п.н.).

Во второй части работы будет рассмотрена способность консервативных G-богатых Alu-фрагментов формировать *in vitro* стабильные внутри- и межмолекулярные GQ, описаны их структура и топология, изучены свойства.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ № 14-25-00013).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hoffman Y., Pilpel Y., Oren M.* (2014) J. Mol. Cell. Biol., **6**, 192-197.
2. *Cui F., Sirotin M.V., Zhurkin V.B.* (2011) Biol. Direct., **6**, 2.
3. *Spengler R.M., Oakley C.K., Davidson B.L.* (2014) Hum. Mol. Genet., **23**, 1783-1793.
4. *Bose P., Hermetz K.E., Conneely K.N., Rudd M.K.* (2014) PLoS ONE, **9**, e101607.
5. *Hoffman Y., Dahary D., Bublik D.R., Oren M., Pilpel Y.* (2013) Bioinformatics, **29**, 894-902.
6. *Batzer M.A., Deininger P.L.* (2002) Nat. Rev. Genet., **3**, 370-379.
7. *Chen L.L., Carmichael GG.* (2008) Cell Cycle, **7**, 3294-3301.
8. *Kleinberger Y., Eisenberg E.* (2010) BMC Genomics, **11**, 453.
9. *Wahlstedt H., Ohman M.* (2011) Wiley Interdiscip. Rev. RNA, **2**, 761-771.
10. *Mallela A., Nishikura K.* (2012) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **47**, 493-501.
11. *Nishikura K.* (2015) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., doi: 10.1038/nrm.2015.4
12. *Saini N., Zhang Y., Usdin K., Lobachev K.S.* (2013) Biochimie, **95**, 117-123.
13. *Bharti S.K., Sommers J.A., Zhou J., Kaplan D.L., Spelbrink J.N., Mergny J.L., Brosh R.M., Jr.* (2014) J. Biol. Chem., **289**, 29975-29993.
14. *Dong D.W., Pereira F., Barrett S.P., Kolesar J.E., Cao K., Damas J., Yatsunyk L.A., Johnson F.B., Kaufman B.A.* (2014) BMC Genomics, **15**, 677.
15. *Kejnovsky E., Tokan V., Lexa M.* (2015) Chromosome Res., **23**, 615-623.
16. *Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L.* (2015) Genet. Med., **17**, 405-424.
17. *Kriegs J.O., Churakov G., Jurka J., Brosius J., Schmitz J.* (2007) Trends Genet. **23**, 158-161.
18. *Лукьянова Т.А., Зайцева М.А., Карпов В.А., Позмогова Г.Е.* (2008) Биоорг. химия, **34**, 83-88.
19. *Татаринова О.Н., Лукьянова Т.Н., Зайцева М.А., Веремеев К.Ю., Карпов В.А., Чувилин А.Н., Петрунин Д.Д., Позмогова Г.Е.* (2008) Бюлл. экспер. биол. мед., **145**, 280-284.
20. *Tatarinova O., Tsvetkov V., Basmanov D., Barinov N., Smirnov I., Timofeev E., Kaluzhny D., Chuvilin A., Klinov D., Varizhuk A., Pozmogova G.* (2014) PLoS ONE, **9**, e89383.
21. *Klinov D.V., Lagutina I.V., Prokhorov V.V., Neretina T., Khil P.P., Lebedev Y.B., Cherny D.I., Demin V.V., Sverdlov E.D.* (1998) Nucl. Acids Res., **26**, 4603-4610.
22. *Li X.M., Zheng K.W., Zhang J.Y., Liu H.H., He Y.D., Yuan B.F., Hao Y.H., Tan Z.* (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **112**, 14581-14586.
23. *Daniel C., Lagergren J., Ohman M.* (2015) Biochimie, **117**, 22-27.
24. *Luo Y., Lu X., Xie H.* (2014) Biomed. Res. Int., **2014**, 784706.
25. *Grandi F.C., An W.* (2013) Mob. Genet. Elements. **3**, e25674.
26. *Burns K.H., Boeke J.D.* (2012) Cell, **149**, 740-752.
27. *Cheng L.C., Pai T.W., Li L.A.* (2012) Steroids, **77**, 100-109.
28. *Zheng K.W., Chen Z., Hao Y.H., Tan Z.* (2010) Nucl. Acids Res., **38**, 327-338.
29. *Husby J., Todd A.K., Platts J.A., Neidle S.* (2013) Biopolymers, **99**, 989-1005.
30. *Mela I., Kranaster R., Henderson R.M., Balasubramanian S., Edwardson J.M.* (2012) Biochemistry, **51**, 578-585.
31. *Henderson A., Wu Y., Huang Y.C., Chavez E.A., Platt J., Johnson F.B., Brosh R.M. Jr., Sen D., Lansdorp P.M.* (2014) Nucl. Acids Res., **42**, 860-869.
32. *Ma D.L., Zhang Z., Wang M., Lu L., Zhong H.J., Leung C.H.* (2015) Chem. Biol., **22**, 812-828.
33. *Rivetti C., Codeluppi S.* (2001) Ultramicroscopy, **87**, 55-66.

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

CONFORMATIONAL POLYMORPHYSM OF G-RICH FRAGMENTS OF DNA ALU-REPEATS. I. POTENTIAL NONCANONICAL STRUCTURES

A.V. Sekridova, A.M. Varizhuk, O.N. Tatarinova, V.V. Severov, N.A. Barinov, I.P. Smirnov, V.N. Lazarev, D.V. Klinov, G.E. Pozmogova

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; tel. +7(499)2464696; fax: +7(499)2464409;
e-mail: pozmge@niifhm.ru

In this paper, we report results of systematic studies of conformational polymorphism of G-rich DNA fragments from Alu repeats. Alu retrotransposones are primate-specific short interspersed elements. Using the Alu sequence from the prooncogen *bcl2* intron and the consensus $AluS_x$ sequence as representative examples, we determined characteristic Alu sites that are capable of adopting G-quadruplex (GQ) conformations (i.e., potential quadruplex sites – PQSAlu), and demonstrated by bioinformatics methods that those sites are Alu-specific in the human genome. Genomic frequencies of PQSAlu were assessed (~1/10000 b.p.). The sites were found to be characteristic of young (active) Alu families (Alu-Y). A recombinant DNA sequence bearing the Alu element from the human *bcl2* gene (304 b.p.) and its PQS-mutant (Alu-PQS) were constructed. The formation of noncanonical structures in Alu_{bcl2} dsDNA and the absence of such structures in the case of Alu-PQS were shown using DMS-footprinting and AFM microscopy. Expression vectors bearing wild-type and mutant Alu insertions in the promoter regions were obtained, and the effects of these insertions on the expression of the reporter gene in HEK293 and HeLa cell lines were compared. Our findings on the spatial organization of Alu repeats may provide insight into the mechanisms of genomic rearrangements which underlie many oncological and neurodegenerative diseases.

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