

УДК 577.323.3

СТАБИЛЬНЫЕ G-КВАДРУПЛЕКСЫ ПРОМОТОРОВ ОНКОГЕНОВ ВЫЗЫВАЮТ ЗАВИСИМЫЕ ОТ ИОНОВ КАЛИЯ ОСТАНОВКИ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

© 2019 Г.В. Чашина^{1,2}, А.Д. Бениаминов¹, Д.Н. Калужный^{1*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: uzhny@mail.ru

² Московский физико-технический институт (государственный университет),
141701 Долгопрудный Московской обл., Россия

Поступила в редакцию 25.10.2018

После доработки 21.12.2018

Принята к публикации 21.12.2018

Амплификация GС-богатых участков геномной ДНК может быть затруднена из-за высокой стабильности двойной спирали ДНК или образования альтернативных структур G-богатой нитью ДНК. Такие последовательности ДНК, потенциально способные образовывать G-квадруплексные (G4) структуры, широко распространены в промоторах генома человека. В работе исследована эффективность ПЦР-амплификации пяти промоторных последовательностей онкогенов человека (*MYC*, *KIT*, *TERT*, *NRAS*, *KRAS*). Показано, что эффективность ДНК-полимеразы в присутствии ионов калия значительно снижена. Методом удлинения праймера локализованы места остановок ДНК-полимеразы на 3'-концах потенциальных G4-структур. Проведен анализ структурных и термодинамических свойств коротких G-богатых олигонуклеотидов, соответствующих местам остановки ДНК-полимеразы. Показано, что олигонуклеотиды образуют параллельные G4-структуры, а также выявлена зависимость между стабильностью G4-структур и эффективностью остановки ДНК-полимеразы. Полученные результаты демонстрируют метод детекции G4-структур в протяженных геномных последовательностях, а также проясняют механизм ингибирования ДНК-полимеразы на G-богатых участках ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, G-квадруплекс, промоторные последовательности, ПЦР, ДНК-полимераза.

DOI: 10.1134/S0320972519050105

Помимо канонической В-формы, молекула ДНК может образовывать множество альтернативных структур, примером которых являются G-квадруплексные (G4) структуры. Биоинформатический анализ показал, что в геноме человека присутствует большое количество высококонсервативных гуаниновых последовательностей, обладающих потенциалом для формирования G4-структур [1–3]. Предполагается, что G4-структуры играют важную роль в биологических процессах: репликации, регуляции транскрипции и др. [4]. Недавние исследования по визуализации G4-структур в клетках показали их существование и распространенность в различных участках хромосом [5]. Повышенный уровень квадруплексных структур, обнаруженный окрашиванием G4-специфичными антителами, характерен для ряда опухолевых клеток [6]. G4-структуры рассматриваются в качестве потенциальных молекулярных мишеней для противоопухолевой терапии [7–9].

Анализ G-богатых областей генома имеет важное практическое значение для скрининга и диагностики некоторых генетических заболеваний [10]. Однако амплификация и секвенирование G-богатых участков ДНК представляет собой серьезную проблему из-за образования вторичных структур, которые могут ингибировать ДНК-полимеразу и приводить к образованию укороченного ПЦР-продукта или к его отсутствию. Для некоторых участков генома показано подавление синтеза ДНК только в присутствии ионов калия и при использовании именно G-богатой цепи в качестве матрицы [11].

Выявление мест остановок ДНК-полимеразы может быть удобным подходом к обнаружению альтернативных структур ДНК, в т.ч. G4-структур, в геномной ДНК [12]. В 1999 г. для отбора соединений, взаимодействующих с G4-ДНК, Han et al. предложили метод, основанный на эффекте остановки ДНК-полимеразы на G-богатой матрице из-за стабилизации G4-структуры. Так, соединение BSU-1051 приводит к остановке синтеза ДНК в присутствии ионов калия пу-

* Адресат для корреспонденции.

тем стабилизации внутримолекулярных G4-структур [13].

Целью данной работы являлся анализ позиций остановок термофильной ДНК-полимеразы в присутствии ионов калия для пяти промоторных последовательностей онкогенов человека (*MYC*, *KIT*, *TERT*, *NRAS*, *KRAS*) и изучение связи эффективности остановки ДНК-полимеразы со стабильностью G4-структур.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Олигонуклеотиды. Модельные олигонуклеотиды и праймеры для ПЦР были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия), флуоресцентно-меченные праймеры – в ООО «ДНК-синтез» (Россия). Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

ПЦР-амплификация фрагментов ДНК. Амплификацию фрагментов ДНК *in vitro* осуществляли при помощи ПЦР с использованием Taq ДНК-полимеразы Encyclo (ЗАО «Евроген», Россия). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 мМ Tris-HCl, pH 9,5; 20 мМ CsCl; 2,5 мМ MgCl₂; 5% DMSO; 0,25 мМ dNTP; 0,5 мкМ праймер; 1 ед активности Taq ДНК-полимеразы Encyclo. В качестве матрицы использовали 100 нг геномной ДНК из культуры клеток человека Raji (ЗАО «Евроген», Россия). Реакционную смесь инкубировали при 95 °С в течение 3 мин, а затем проводили 30 циклов ПЦР по программе: 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; терминальная элонгация – 3 мин при 72 °С. Продукты реакции разделяли в 2%-ном агарозном геле. После электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1,5 мкг/мл) и

анализировали в УФ-свете, используя трансиллюминатор GelDoc™ XR+ («Bio-Rad», США).

Удлинение флуоресцентно-меченного праймера.

Реакцию удлинения праймера проводили в 25 мкл смеси, содержащей 20 мМ Tris-HCl, pH 9,5; 2,5 мМ MgCl₂; 5% DMSO; 8% PEG 200; 20 мМ CsCl; 0,1 мМ dNTP; 0,5 ед активности Taq ДНК-полимеразы Encyclo; 2 нМ ДНК-матрицу; 100 нМ флуоресцентно-меченный праймер. Концентрацию KCl варьировали от 0 до 50 мМ.

Реакционная смесь для секвенирования по Сэнгеру (25 мкл) содержала: 20 мМ Tris-HCl, pH 9,5; 2,5 мМ MgCl₂; 5% DMSO; 8% PEG 200; 20 мМ CsCl; 2 нМ ПЦР-продукт; 0,1 мкМ флуоресцентно-меченный праймер; 0,1 мМ dNTP; 0,5 ед активности SNP-полимеразы (ЗАО «Евроген», Россия). Для получения четырех секвенирующих дорожек геля ddG, ddA, ddT и ddC добавляли в указанную смесь до концентрации 0,1; 1; 0,1 и 0,01 мкМ соответственно. Обозначение дорожек на секвенирующем геле соответствует ddNTP, добавленному в реакционную смесь. Полученные реакционные смеси инкубировали при 95 °С в течение 3 мин, а затем проводили 20 циклов амплификации: денатурация при 95 °С – 30 с; отжиг – 30 с; удлинение праймера при 72 °С – 30 с. Температуры отжига праймеров подбирали при помощи программы OligoAnalyzer Tool (www.idtdna.com) и корректировали опытным путем.

Образцы осаждали добавлением 200 мкл 0,3 М ацетата натрия (pH 5,3) и 600 мкл 96%-ного этанола с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 14 000 об/мин. После промывания 70%-ным этанолом к образцам добавляли раствор, содержащий 30 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,8; 80%-ный формамид; 0,025%-ный

Таблица 1. Праймеры, использованные для анализа промоторных участков онкогенов человека

Название гена	Последовательности праймеров для амплификации промоторных участков генов (5'-3')	Последовательности флуоресцентно-меченных праймеров для локализации мест остановки ДНК-полимеразы (5'-3')
<i>MYC</i>	F: d(GAGGAGCAGCAGAGAAAGGG) R: d(TCCCTCCGTTCTTTTCCCG)	FAM-d(AGTGCTCGGCTGCCCGGCTG)
<i>KIT</i>	F: d(GTGGAGAGAGAAAGGGGCTC) R: d(AAGCAGTAGGAGCAGAACGC)	FAM-d(CGCCGGCCACGCCCT)
<i>TERT</i>	F: d(CAGCGCTGCCTGAAACTC) R: d(GGCCGATTCGACCTCTCT)	FAM-d(CTTCCAGCTCCGCCTCCTCC)
<i>NRAS</i>	F: d(AAATGTTGGAGACCCCGGAA) R: d(TCTCTGGGTAAAGAGGCCGT)	FAM-d(CGAACCACGAGTCATGCG)
<i>KRAS</i>	F: d(AGAGCTATCGATGCGTTCCG) R: d(TTCGACGTTCTCTGTGGAG)	FAM-d(TCTCCCGCCGGCGC)

бромфеноловый синий и 0,025%-ный ксиленцианол, денатурировали в течение 5 мин при 95 °С и наносили на 10%-ный ПААГ (акриламид : бисакриламид 19 : 1), содержащий 7 М мочевины и 1× ТВЕ-буфер. Гель визуализировали на флуоресцентном сканере Typhoon 9500 («GE Healthcare», США).

Подвижность олигонуклеотидов в ПААГ. Отжиг модельных олигонуклеотидов (4 мкМ) для формирования квадруплексных структур проводили в буфере (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 2,5 мМ MgCl₂; 20 мМ CsCl; 7,5 мМ KCl) путем нагревания при 95 °С в течение 5 мин и быстрого охлаждения во льду. Образцы наносили на 8%-ный ПААГ (акриламид : бисакриламид 19 : 1), содержащий 20 мМ KCl и 0,5× ТВЕ-буфер. Электрофорез проводили в электродном 0,5× ТВЕ-буфере с 20 мМ KCl при 12 В. После электрофореза гель окрашивали красителем SYBR Gold («Invitrogen», США) и сканировали на флуоресцентном сканере Typhoon 9500 («GE Healthcare», США).

Круговой дихроизм (КД). Спектры КД записывали на спектрополяриметре Jasco J715 («Jasco», Япония), оснащенный термостатируемой ячейкой Пельтье, с использованием кварцевой кюветы. Длина оптического пути – 1 см, скорость сканирования – 100 нм/мин, время отклика – 1 с. Данные КД получали усреднением трех сканирований. Спектры регистрировали при 25 °С в диапазоне длин волн 220–320 нм. Температурную зависимость КД исследовали в диапазоне температур 20–90 °С. Данные получены для 4 мкМ олигонуклеотидов в буфере (2,5 мМ MgCl₂; 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 20 мМ CsCl) и при добавлении 20 мМ KCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Квадруплексные последовательности ДНК уменьшают эффективность ПЦР в зависимости от концентрации ионов калия. Известно, что потенциальные квадруплексные последовательности широко распространены в промоторах генома человека и могут быть вовлечены в регуляцию экспрессии генов [7, 14]. ПЦР-амплификация таких G-богатых промоторных участков генома в стандартных для ДНК-полимераз буферах часто проходила с крайне низким выходом ПЦР-продуктов, что подтолкнуло нас к проведению данного исследования. Пять участков генома, соответствующих промоторным областям онкогенов человека (*MYC*, *KIT*, *TERT*, *NRAS*, *KRAS*), были выбраны для исследования причин низкой эффективности амплификации и поиска способов преодоления данной проблемы.

Все выбранные промоторные области содержат последовательности, способные образовывать G4-структуры ДНК. Известно, что стабильность G4-структур зависит от присутствия одновалентных ионов: ионы калия сильно стабилизируют G4-структуры, в то время как ионы цезия и лития дестабилизируют их. Большинство буферов для термофильных ДНК-полимераз содержат соли калия в концентрациях 20–50 мМ. Также известно, что активность ДНК-полимераз часто снижается при увеличении концентрации ионов калия [15, 16]. Ранее было показано, что ионы цезия в значительно меньшей степени влияют на активность ДНК-полимеразы, чем ионы лития [17]. Подбирая оптимальные условия для амплификации, было решено заменить ионы калия на другие одновалентные противоионы. Оказалось, что замена KCl на CsCl позволила получить более высокий выход ПЦР-продуктов. При помощи ПЦР в присутствии 20 мМ CsCl были наработаны участки промоторов пяти онкогенов.

Известно, что G4-структуры могут оказывать влияние на эффективность ПЦР. Проведено сравнение эффективности амплификации фрагментов, содержащих и не содержащих квадруплексные последовательности, при повышении концентрации KCl в реакционной смеси (рис. 1).

Была обнаружена тенденция к уменьшению количества полноразмерного ПЦР-продукта при увеличении концентрации ионов калия в реакционной смеси. Данный эффект может быть обусловлен несколькими причинами: снижением активности ДНК-полимеразы в неоптимальном буфере, увеличением стабильности двойной спирали при увеличении ионной силы, а также остановами ДНК-полимеразы на квадруплексных участках. Для участка промоторной области гена *TERT* наблюдалось значительное снижение выхода ПЦР-продукта уже при концентрациях 20–30 мМ KCl, в то время как уровень амплификации участка, не содержащего квадруплексных последовательностей, незначительно снижался, по всей видимости, из-за снижения активности ДНК-полимеразы в растворе с высокой ионной силой [15, 16]. Таким образом, было обнаружено зависимое от ионов калия значительное снижение эффективности амплификации участков ДНК, содержащих квадруплексные последовательности.

Локализация мест остановки ДНК-полимеразы в зависимости от концентрации ионов калия. Чтобы показать, что квадруплексные структуры, стабилизированные ионами калия, могут препятствовать работе ДНК-полимеразы, был проведен анализ продуктов удлинения флуоресцентно-

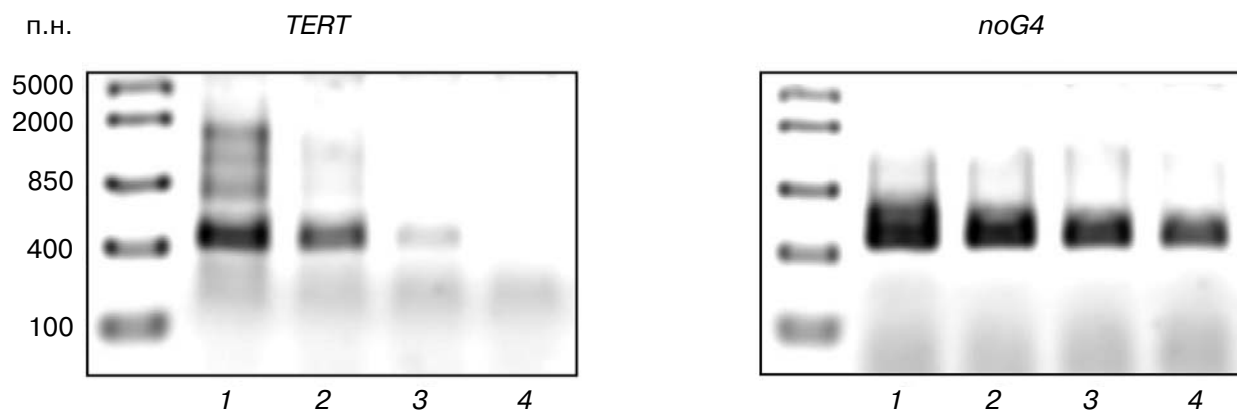


Рис. 1. Эффективность ПЦР-амплификации потенциальной квадруплексной последовательности промотора гена теломеразы человека *TERT* (378 п.н.) и контрольной последовательности *noG4* (486 п.н.), не содержащей квадруплексных последовательностей, с использованием Таq ДНК-полимеразы Epcuslo («Евроген», Россия) при увеличении концентрации ионов калия в реакционном буфере: дорожки 1–4 – 10, 20, 30 и 40 мМ KCl соответственно

меченного праймера. Праймер выбирали таким образом, чтобы матричная нить содержала G-богатые потенциальные квадруплексные участки (табл. 1). Длину продуктов удлинения анализировали в денатурирующем ПААГ, сравнивая с нуклеотидной последовательностью, прочитанной с того же праймера (рис. 2). Удлинение флуоресцентно-меченного праймера было проведено

при различных концентрациях KCl (0–50 мМ) на матрице ДНК, полученной с помощью ПЦР и соответствующей участкам промоторных областей онкогенов.

Прямая зависимость эффективности остановки ДНК-полимеразы от концентрации ионов калия обнаружена для последовательностей промоторных участков всех пяти генов. Для

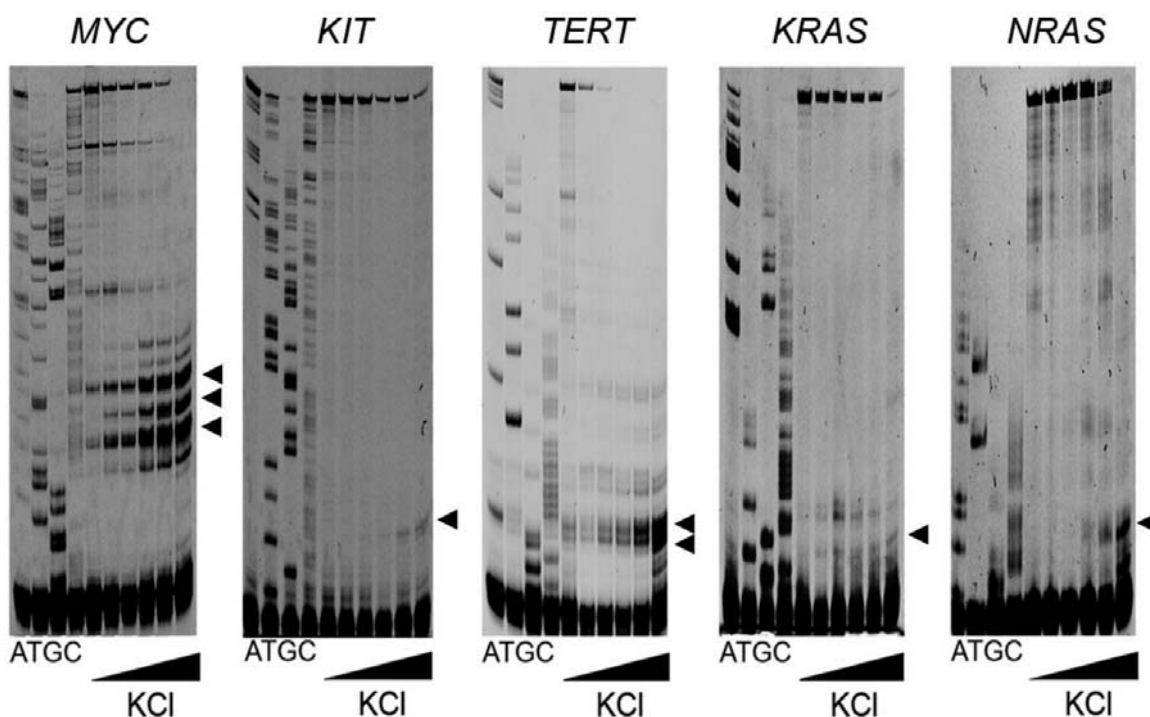


Рис. 2. Продукты удлинения флуоресцентно-меченного праймера на квадруплексных последовательностях в промоторных областях пяти онкогенов человека (*MYC*, *KIT*, *TERT*, *NRAS*, *KRAS*) при увеличении концентрации ионов калия: 0, 2, 5, 10, 20 и 50 мМ. Для определения точных мест остановок ДНК-полимеразы проводили секвенирование ДНК методом Сэнгера (первые четыре дорожки). Профиль получен в денатурирующем 10%-ном ПААГ. Места остановки ДНК-полимеразы отмечены черными треугольниками

последовательностей генов *MYC*, *NRAS* и *TERT* наблюдаются несколько остановок, для которых зависимость от концентрации ионов калия очевидна и ярко выражена: укороченные вследствие остановки ДНК-полимеразы ПЦР-продукты появились даже при минимальной концентрации ионов калия (2 мМ). Для последовательностей генов *KRAS* и *KIT* также выявлены позиции остановок ДНК-полимеразы, однако эффект зависимости от ионов калия выражен слабее, т.е. позиции остановок обнаруживаются при более высоких концентрациях ионов калия. Это может быть связано с тем, что потенциальные квадруплексные участки в промоторах этих генов формируют менее стабильные G-квадруплексные структуры.

Места остановок ДНК-полимеразы были соотнесены с позициями квадруплексных последовательностей ДНК. Как видно из рис. 3, места остановок совпадают с 3'-концом последовательности, способной образовывать G4-структуру.

Для некоторых последовательностей характерно обнаружение нескольких позиций остановок ДНК-полимеразы внутри G-богатых участков. Было замечено, что более длинные G-богатые повторы могут формировать несколько раз-

личных квадруплексных структур, при этом возможность формирования одной из них исключает формирование других. Каждый G-богатый участок может иметь равные возможности для формирования G-квадруплексной структуры.

Для проверки данной гипотезы было синтезировано несколько модельных олигонуклеотидов, 3'-конец которых совпадает с местом остановки ДНК-полимеразы, а их последовательности содержат только четыре гуаниновых блока. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для изучения межмолекулярных агрегатов квадруплексных структур, а также топологии и стабильности квадруплексов методом КД, приведены на рис. 3. Квадруплексные структуры, образованные последовательностями, которые оканчиваются на повторяющиеся остатки гуанозина, склонны к агрегации. Для уменьшения межмолекулярной агрегации к последовательностям олигонуклеотидов на 5'- и 3'-концы были добавлены динуклеотиды ТТ.

Известно, что внутримолекулярные G-квадруплексные структуры в неденатурирующем ПААГ мигрируют быстрее, чем однонитевая ДНК той же длины. При помощи электрофореза в ПААГ олигонуклеотиды были проверены на предмет образования межмолекулярных агрега-

<i>MYC</i> Q-myc1 Q-myc2 Q-myc3	5'...AGGGGCGCTTAT GGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGGTGGGGAGGAG ACT...-3' TTGGGTGGGGAGGGTGGGGTT TTGGGGAGGGTGGGGAAGGTGGGGTT TTGGGTGGGGAAGGTGGGGAGGAGTT
<i>KIT</i> Q-kit	5'...CGCCGGGAAGAAGCGAGACCC GGGCGGGCGCGAGGGAGGGG AGGC...-3' TTGGGCGGGCGCGAGGGAGGGTT
<i>TERT</i> Q-tert1 Q-tert2	5'...AGGGGGCTGGGCCGGGGACCC GGGAGGGGCGGGACGGGGCGGGGTCCGCGC ...-3' TTGGGGCGGGACGGGGCGGGGTCTT TTCGGGAGGGGCGGGACGGGGCTT
<i>KRAS</i> Q-kras	5'...AGGGAGCGGCT GAGGGCGGTGTGGGAAGAGGGAAGAGGGGGAG GCAGCGA...-3' TTGAGGGCGGTGTGGGAAGAGGGAAGAGGGGGATT
<i>NRAS</i> Q-nras	5'...GAAACGTCCCCTGT GGGAGGGGCGGGTCTGGG TGCGGCCTGC...-3' TTGGGAGGGGCGGGTCTGGTT

Рис. 3. Локализация остановок ДНК-полимеразы на промоторных последовательностях пяти онкогенов человека (*MYC*, *KIT*, *TERT*, *NRAS*, *KRAS*). Места остановок ДНК-полимеразы (отмечены черными треугольниками) соотнесены с нуклеотидными последовательностями исследуемых участков ДНК. Потенциальная квадруплексная последовательность подчеркнута и выделена полужирным шрифтом. Последовательности модельных олигонуклеотидов, используемых для подтверждения структуры, приведены под нуклеотидными последовательностями промоторов. Для уменьшения межмолекулярной агрегации к последовательностям модельных олигонуклеотидов на 5'- и 3'-концы были добавлены динуклеотиды ТТ

тов (рис. 4). В качестве контролей были взяты олигонуклеотид TQ24 d(TTAGGGTTAGGGT-TAGGGTTAGGG), формирующий квадруплекс, и его мутантная форма TelM d(TTAGGGT-TAGAGTTAGGGTTAGGG) с заменой в одном нуклеотиде (подчеркнута), которая препятствует образованию квадруплекса.

Сравнение подвижности олигонуклеотидов в геле с подвижностью контрольной пары TQ24–TelM позволяет предположить, что все модельные олигонуклеотиды образуют внутримолекулярные G4-структуры. Можно заметить небольшую долю полос с меньшей подвижностью, которые могут соответствовать межмолекулярным комплексам. Доля таких межмолекулярных агрегатов составляет не более ~5–10% для каждой олигонуклеотидной модели. Таким образом, было установлено, что выбранные олигонуклеотиды образуют главным образом внутримолекулярные структуры.

Вероятность остановки ДНК-полимеразы зависит от стабильности квадруплексной структуры. Для определения конформации и термодинамической стабильности структур, образованных модельными олигонуклеотидами, был применен метод кругового дихроизма, являющийся высокочувствительным к структурным изменениям в нуклеиновых кислотах. На рис. 5, а, в приведены спектры КД для олигонуклеотидов Q-myc1 и Q-tert1 в присутствии ионов цезия или ионов калия. Для остальных олигонуклеотидов изменения в спектрах КД имели схожий характер (данные не приведены). Спектры КД, полученные в растворе с ионами калия, имеют положи-

тельную полосу с максимумом при 265 нм и отрицательную с максимумом при 240 нм, что характеризует образование параллельных G-квадруплексов. При наличии в буфере ионов цезия спектры КД характеризуются меньшей амплитудой, что может говорить о неполном формировании G4-структуры или о меньшей ее стабильности. Для некоторых олигонуклеотидов (Q-myc2, Q-myc3, Q-nras, Q-tert1) наблюдался небольшой положительный пик при 295 нм, что может свидетельствовать о присутствии конформаций, альтернативных параллельным G4-структурам. В данном случае возможно присутствие небольшого количества антипараллельных или смешанных G-квадруплексов.

Для определения термостабильности образованных структур была получена температурная зависимость амплитуды КД при 265 нм. На рис. 5, б, г приведены данные для олигонуклеотидов Q-myc1 и Q-tert1 (аналогичные изменения были выявлены для всех олигонуклеотидов). Падение амплитуды при 265 нм характеризует переход из G4-конформации к денатурированной форме олигонуклеотида. По положению полуперевода между этими формами можно оценить температуру плавления G4-структур (табл. 2). Как и ожидалось, термостабильность G4-структур в присутствии ионов калия значительно выше, чем в присутствии ионов цезия.

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что температура плавления для модельных олигонуклеотидов близка к температуре, при которой работает ДНК-полимераза в линейной ПЦР (72 °С). В связи с этим для каждой олигонуклеотидной модели была оценена доля нативных (неденатурированных) структур при 72 °С. Оказалось, что эффективность остановок ДНК-полимеразы связана с долей G4-структур при температуре проведения линейной ПЦР.

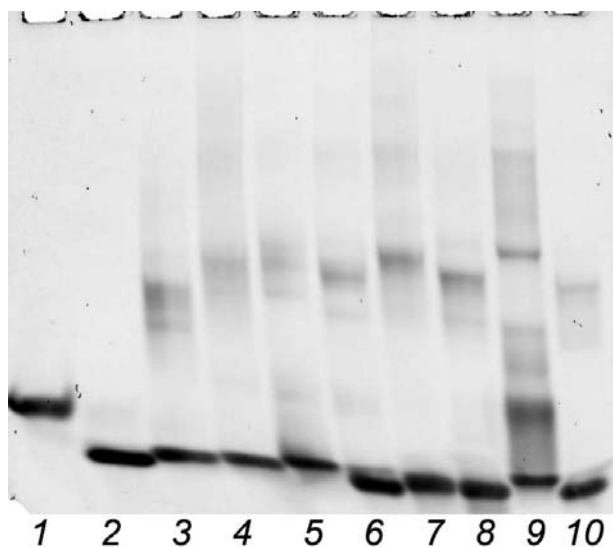


Рис. 4. Подвижность G4-структур, образованных модельными олигонуклеотидами в нативных условиях: 1 – TelM, 2 – TQ24, 3 – Q-myc1, 4 – Q-myc2, 5 – Q-myc3, 6 – Q-kit, 7 – Q-tert1, 8 – Q-tert2, 9 – Q-kras, 10 – Q-nras

Таблица 2. Результаты анализа температурной зависимости кругового дихроизма изученных модельных олигонуклеотидов в присутствии 20 мМ ионов калия

Модельные олигонуклеотиды	Температура плавления, °С	Доля неденатурированных G4-структур при 72 °С, %
Q-myc1	80	77
Q-myc2	68	28
Q-myc3	75	52
Q-kit	68	38
Q-tert1	74	60
Q-tert2	66	24
Q-nras	59	14
Q-kras	54	5

Результаты термодинамического плавления подтверждают высказанное нами ранее предположение о том, что последовательности G-квадруплексных участков в промоторах генов *MYC*, *NRAS* и *TERT* образуют более устойчивые или стабильные структуры, чем в промоторах генов *KRAS* и *KIT*. Нами впервые показано, что эффективность останковки ДНК-полимеразы на G-богатых участках промоторов онкогенов зависит от стабильности G4-структур.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании было определено положение G-квадруплексных структур в промоторных участках пяти онкогенов человека. Большинство известных G4-структур было изучено на коротких модельных одно- или двухцепочечных последовательностях ДНК. Особенность данной работы состоит в том, что нами были использованы природные длинные двух-

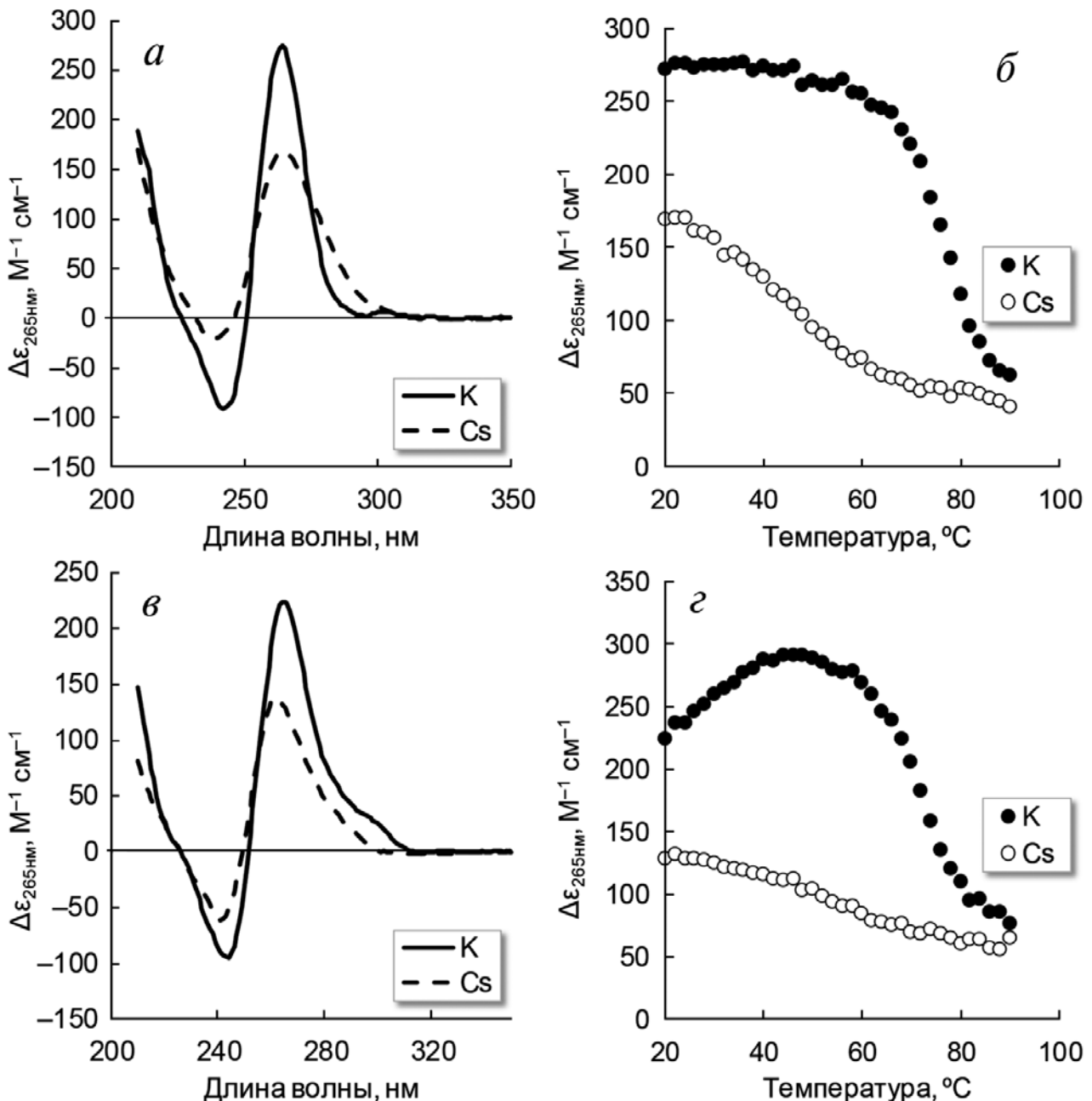


Рис. 5. Спектры КД и температурная зависимость амплитуды КД модельных олигонуклеотидов Q-myc1 (*a, б*) и Q-tert1 (*в, г*) при длине волны 265 нм в присутствии 20 мМ ионов калия (сплошная кривая и заштрихованные кружки) и 20 мМ ионов цезия (пунктирная кривая и незаштрихованные кружки). Концентрация олигонуклеотидов – 4 мкМ

цепочечные участки ДНК из промоторов онкогенов человека (*MYC*, *NRAS*, *TERT*, *KRAS*, *KIT*), содержащие квадруплексные последовательности. Продемонстрировано, что остановки ДНК-полимеразы при продвижении по G-богатой нити происходят на 3'-концах квадруплексных последовательностей. Это позволяет предположить, что остановки ДНК-полимеразы связаны с появлением препятствия в результате образования термодинамически устойчивой G4-структуры. Обнаруженная нами связь между эффективностью возникновения остановок ДНК-полимеразы и термостабильностью квадруплекса подтверждает это предположение. Таким образом, методом остановки ДНК-полимеразы в присутствии ионов калия нами локализованы G4-структуры, способные образовываться в промоторах онкогенов человека.

Полученные результаты хорошо согласуются с некоторыми данными, описанными в литературе. Так, подтверждается модель G4-структуры в промоторе *TERT*, которая была предложена Palumbo et al. [18]. Позже данная модель была улучшена Chaires et al. [19]. Один из самых стабильных модельных олигонуклеотидов Q-му1 совпадает с 3'-концом хорошо изученной последовательности pu27 (5'-TGGGAGGGTGGGGA-GGGTGGGG-3') промотора гена *MYC* [20]. Метод остановки ДНК-полимеразы позволил обнаружить большее число G4-структур в промоторе *MYC* ближе к старту транскрипции гена. Согласно нашим результатам, выявленные G4-структуры являются менее стабильными. В промоторе гена *KIT* известны два потенциальных квадруплексных участка c-kit1 и c-kit2. Структура, образованная последовательностью c-kit2, полностью согласуется с полученными нами результатами. Для данной последовательности параллельная квадруплексная структура была установлена ранее методом ЯМР [21]. Обнаруженная нами G4-структура в промоторе ге-

на *KRAS* была ранее исследована при помощи кругового дихроизма и фотохимического зондирования G4-ДНК [22], и было показано участие данной альтернативной структуры ДНК в регуляции экспрессии гена *KRAS*.

ДНК-квадруплекс в промоторе гена *NRAS* ранее детектирован не был, однако была показана возможность формирования РНК-квадруплекса, который находится в 5'-некодируемой области гена *NRAS* [23]. Обнаруженная нами позиция остановки ДНК-полимеразы соответствует положению хорошо изученного РНК-квадруплекса гена *NRAS*. Таким образом, используемый метод остановки ДНК-полимеразы позволяет детектировать не только ДНК-квадруплексы, но и указывать на наличие РНК-квадруплексов в транскрипте данного участка.

При помощи метода удлинения флуоресцентно-меченного праймера было показано, что квадруплексные структуры, стабилизированные ионами калия, могут препятствовать работе ДНК-полимеразы. Впервые продемонстрировано, что эффективность остановки ДНК-полимеразы на квадруплексных участках коррелирует со стабильностью соответствующей квадруплексной структуры. Более стабильные квадруплексы ингибируют амплификацию ДНК более эффективно. Данный метод можно использовать для детекции не только ДНК-квадруплексов, но и РНК-квадруплексных структур.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10396).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lam, E.Y.N., Beraldi, D., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2013) G-Quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA, *Nat. Commun.*, **4**, 1796, doi: 10.1038/ncomms2792.
- Todd, A.K., Johnston, M., and Neidle, S. (2005) Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2901–2907, doi: 10.1093/nar/gki553.
- Verma, A., Halder, K., Halder, R., Yadav, V.K., Rawal, P., Thakur, R.K., Mohd, F., Sharma, A., and Chowdhury, S. (2008) Genome-wide computational and expression analyses reveal G-quadruplex DNA motifs as conserved *cis*-regulatory elements in human and related species, *J. Med. Chem.*, **51**, 5641–5649, doi: 10.1021/jm800448a.
- Bochman, M.L., Paeschke, K., and Zakian, V.A. (2012) DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 770–780, doi: 10.1038/nrg3296.
- Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., and Balasubramanian, S. (2013) Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells, *Nat. Chem.*, **5**, 182–186, doi: 10.1038/nchem.1548.
- Biffi, G., Tannahill, D., Miller, J., Howat, W.J., and Balasubramanian, S. (2014) Elevated levels of G-quadruplex formation in human stomach and liver cancer tissues, *PLoS One*, **9**, e102711, doi: 10.1371/journal.pone.0102711.
- Balasubramanian, S., Hurley, L.H., and Neidle, S. (2011) Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anti-

- cancer strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 261–275, doi: 10.1038/nrd3428.
8. Tauchi, T., Shin-ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Okabe, S., Ohyashiki, J.H., and Ohyashiki, K. (2006) Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: *in vitro* and *in vivo* studies in acute leukemia, *Oncogene*, **25**, 5719–5725, doi: 10.1038/sj.onc.1209577.
 9. Ilyinsky, N.S., Varizhuk, A.M., Beniaminov, A.D., Puzanov, M.A., Shchyolkina, A.K., and Kaluzhny, D.N. (2014) G-quadruplex ligands: mechanisms of anticancer action and target binding, *Mol. Biol.*, **48**, 778–794, doi: 10.1134/s0026893314060077.
 10. Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A.J., Shaw, P.G., Kim, M.-S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J.D., and Wang, J. (2014) *C9orf72* nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease, *Nature*, **507**, 195–200, doi: 10.1038/nature13124.
 11. Woodford, K.J., Howell, R.M., and Usdin, K. (1994) A novel K⁺-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27029–27035.
 12. Kumari, R., Nambiar, M., Shanbagh, S., and Raghavan, S.C. (2015) Detection of G-quadruplex DNA using primer extension as a tool, *PLoS One*, **10**, e0119722, doi: 10.1371/journal.pone.0119722.
 13. Han, H., Hurley, L.H., and Salazar, M. (1999) A DNA polymerase stop assay for G-quadruplex-interactive compounds, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 537–542.
 14. Qin, Y., and Hurley, L.H. (2008) Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions, *Biochimie*, **90**, 1149–1171, doi: 10.1016/j.biochi.2008.02.020.
 15. Klenow, H., and Henningsen, I. (1969) Effect of monovalent cations on the activity of the DNA polymerase of *Escherichia coli* B, *Eur. J. Biochem.*, **9**, 133–141.
 16. Abu Al-Soud, W., and Radstrom, P. (1998) Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3748–3753.
 17. Ramos-Aleman, F., Gonzalez-Jasso, E., and Pless, R.C. (2018) Use of alternative alkali chlorides in RT and PCR of polynucleotides containing G quadruplex structures, *Anal. Biochem.*, **543**, 43–50, doi: 10.1016/j.ab.2017.11.021.
 18. Palumbo, S.L., Ebbinghaus, S.W., and Hurley, L.H. (2009) Formation of a unique end-to-end stacked pair of G-quadruplexes in the hTERT core promoter with implications for inhibition of telomerase by G-quadruplex-interactive ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10878–10891, doi: 10.1021/ja902281d.
 19. Chaires, J.B., Trent, J.O., Gray, R.D., Dean, W.L., Buscaglia, R., Thomas, S.D., and Miller, D.M. (2014) An improved model for the hTERT promoter quadruplex, *PLoS One*, **9**, e115580, doi: 10.1371/journal.pone.0115580.
 20. Phan, A.T., Modi, Y.S., and Patel, D.J. (2004) Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human *c-myc* promoter, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8710–8716, doi: 10.1021/ja048805k.
 21. Hsu, S.T., Varnai, P., Bugaut, A., Reszka, A.P., Neidle, S., and Balasubramanian, S. (2009) A G-rich sequence within the *c-kit* oncogene promoter forms a parallel G-quadruplex having asymmetric G-tetrad dynamics, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13399–13409, doi: 10.1021/ja904007p.
 22. Cogoi, S., and Xodo, L.E. (2006) G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2536–2549, doi: 10.1093/nar/gkl286.
 23. Kumari, S., Bugaut, A., and Balasubramanian, S. (2008) Position and stability are determining factors for translation repression by an RNA G-quadruplex-forming sequence within the 5'-UTR of the NRAS proto-oncogene, *Biochemistry*, **47**, 12664–12669, doi: 10.1021/bi8010797.

STABLE G-QUADRUPLEX STRUCTURES IN ONCOGENE PROMOTERS INDUCE POTASSIUM-DEPENDENT STOPS OF THERMOSTABLE DNA POLYMERASE

G. V. Chashchina^{1,2}, A. D. Beniaminov¹, and D. N. Kaluzhny^{1*}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: uzhny@mail.ru

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Received October 25, 2018

Revised December 21, 2018

Accepted December 21, 2018

Amplification of GC-rich regions of genomic DNA can be hindered either by the high stability of DNA double helix or as a result of an alternative structure formation by guanine-rich DNA strand. Such potential G-quadruplex (G4) sequences are fairly common in promoters of the human genome. The efficiency of PCR amplification of promoter sequences for five human oncogenes (*MYC*, *NRAS*, *TERT*, *KRAS*, *KIT*) was studied. We demonstrate that the efficiency of DNA polymerase is reduced in the presence of potassium ions. Primer-extension technique localized DNA polymerase stops at the 3'-ends of potential quadruplex sequences. Analysis of structural and thermodynamic properties of short G-rich oligonucleotides corresponding to the stops of DNA polymerase was carried out. The oligonucleotides formed stable parallel G-quadruplexes in the presence of potassium ions. Correlation between the stability of G4 structures and the efficiency of DNA polymerase stops was revealed. The results provide the method of detecting G4 structures in extended genomic sequences and clarify the mechanism of inhibition of DNA polymerase in G-rich regions of DNA.

Keywords: DNA, G-quadruplex, promoter sequences, PCR, DNA polymerase