

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.323.3

### ОКИСЛЕНИЕ ПОРФИРИНОМ ZnP1 G4-СТРУКТУР В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *MYC* И *TERT*

© 2023 г. Г. В. Чашина<sup>а</sup>, Д. Н. Калужный<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,  
Москва, 119991 Россия

\*e-mail: [uzhny@mail.ru](mailto:uzhny@mail.ru)

Поступила в редакцию 10.11.2022 г.

После доработки 04.12.2022 г.

Принята к публикации 06.12.2022 г.

Формирование G4-структур в двойной спирали ДНК конкурирует с комплементарной нитью. Локальное окружение в ДНК может изменять равновесные G-квадруплексы, изучаемые на одонитевых моделях. Для обнаружения квадруплексов в промоторных областях генома необходимы методы их локализации в составе протяженных ДНК природной последовательности. Порфириновое производное ZnP1 избирательно связывается и приводит к фотоиндуцируемому окислению гуанина в G-квадруплексах в модельных системах с одноцепочечной и двухцепочечной ДНК. На примере нативной последовательности промоторных участков онкогенов *MYC* и *TERT* нами показано окислительное действие ZnP1 в областях, потенциально способных формировать G4-структуры. Установлены и отнесены к нуклеотидной последовательности одонитевые разрывы в G-богатой нити двойной спирали, вызванные окислением гуанина под действием ZnP1 и последующим расщеплением цепи ДНК Fpg гликозилазой. Обнаруженные сайты разрывов соответствовали последовательностям, потенциально способным формировать G-квадруплексы. Таким образом, продемонстрирована возможность использования порфирина ZnP1 для идентификации и локализации G-квадруплексов в составе протяженных участков генома. Получены новые данные о возможности сворачивания G4-структур в присутствии комплементарной нити в контексте двойной спирали ДНК природной последовательности.

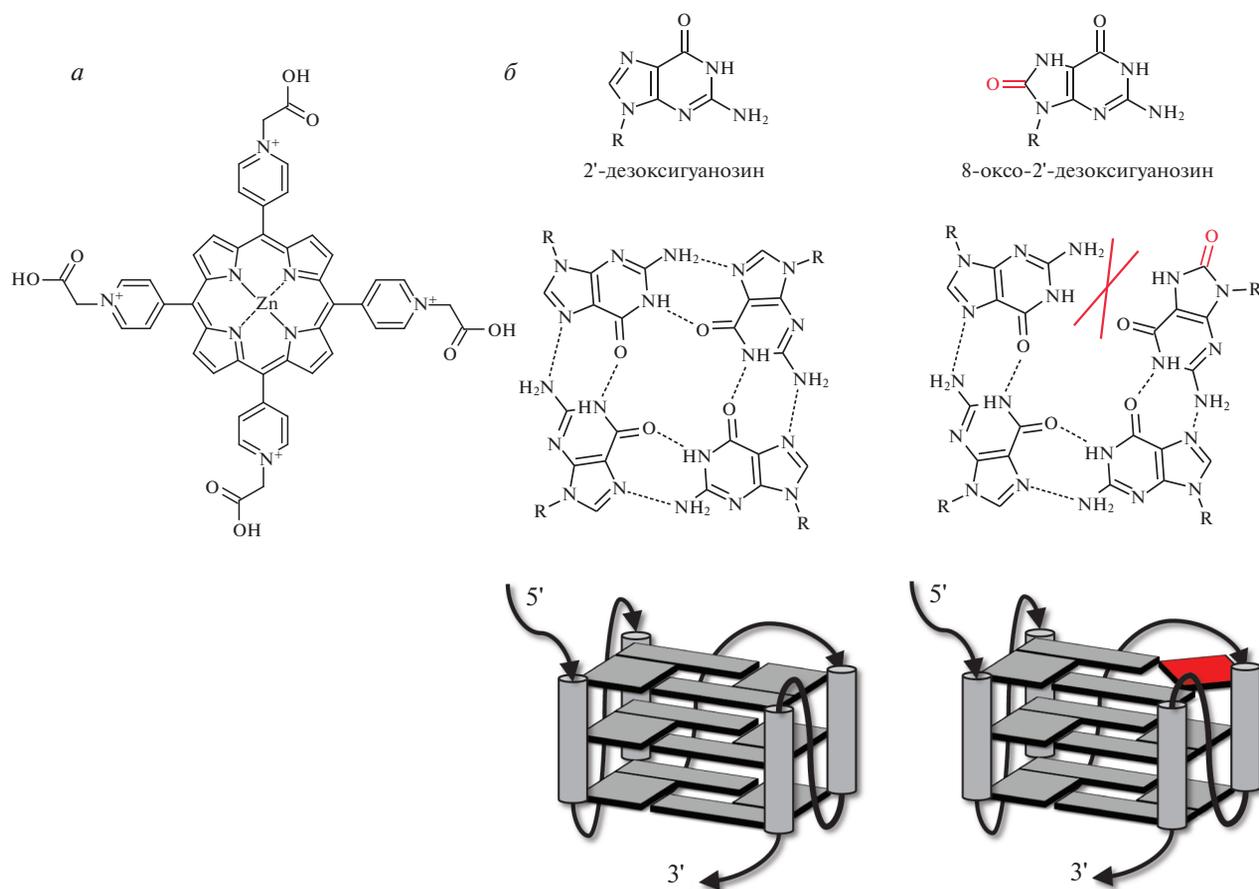
**Ключевые слова:** G-квадруплексы, порфирин, фотосенсибилизаторы, окисление ДНК

**DOI:** 10.31857/S0026898423030035, **EDN:** CGYDDDB

Богатые гуанином последовательности ДНК могут складываться в неканонические вторичные структуры, называемые G-квадруплексами (G4). Появляется все больше доказательств, что G4-структуры нуклеиновых кислот участвуют в различных биологических процессах, таких как транскрипция, репликация и трансляция; а также влияют на стабильность генома и обеспечивают контроль экспрессии генов [1–3]. В результате полногеномного секвенирования 12 видов организмов выявлено более 3.5 млн участков ДНК, потенциально способных образовывать G4-структуры. Сильное обогащение такими последовательностями выявлено в промоторных областях и точках начала транскрипции у высших организмов: например, человека и мыши [4, 5].

Много данных по стабильности и конформации G4-структур получено биофизическими, спектральными и структурными методами (ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и рентгеноструктурный анализ (РСА)). Информация о G4-струк-

турах и их комплексах с лигандами систематизирована в различных базах данных [6]. Традиционно в таких исследованиях используют относительно короткие синтетические одно- (оц) или двухцепочечные (дц) фрагменты ДНК. Внесение мутаций в модельные олигонуклеотиды позволяет с высокой достоверностью охарактеризовать одну G4-структуру. Главный недостаток таких методов и подходов – отсутствие информации о влиянии локального окружения. Неизвестно, какое влияние оказывает комплементарная нить при формировании G4-структур в промоторных областях генома. Природные последовательности могут содержать несколько перекрывающихся G4-участков, способных образовывать множество вариантов складывания неканонических структур. На текущий момент до конца не изучено, какие именно G4-структуры образуются в присутствии комплементарной нити ДНК. Более термодинамически стабильные G4-структуры исключают образование менее стабильных [7]. Однако до-



**Рис. 1.** Схематическое изображение исследуемых веществ. *a* – Структура порфирина ZnP1. *б* – Окисление одного из гуанинов в составе G-квадруплекса приводит к дестабилизации структуры в целом. R – дезоксирибоза.

полнительные взаимодействия между структурами внутри протяженной дцДНК могут изменять стабильность G4-структуры, образованной одной последовательностью, в пользу соседней.

Разработка методов обнаружения неканонических структур и их локализация в протяженных дцДНК особенно актуальна для исследования участков генома, потенциально вовлеченных в регуляцию биологических процессов. Классическим подходом к химическому зондированию ДНК, в том числе G4-структур, считается модификация с использованием диметилсульфата (DMS) [8]. Гуанины, вовлеченные в образование G4-структур, не доступны для модификации DMS. Использование этой методики позволяет обнаружить стабильные участки, полностью образующие структуры ДНК, альтернативные двойной спирали. При частичном или динамическом формировании G4-структур в оцДНК или дцДНК не удается регистрировать короткоживущие альтернативные структуры [9]. Для детекции таких динамически образующихся G4-структур необходимы агенты, направленные именно на неканонически свернутые нуклеиновые кислоты.

Использование порфиринов в качестве структурного зонда имеет ряд преимуществ перед DMS-зондированием. Фотоиндуцируемое окисление ДНК под действием порфиринов способно распознать даже незначительную фракцию G4-структур и слабо чувствительно к дцДНК [10, 11]. Порфириновое производное ZnP1 (рис. 1*a*) связывается с малой бороздкой ДНК [12], при этом аффинность ZnP1 выше к G4-структурам, чем к дцДНК. Ранее показано [10], что связывание ZnP1 с ДНК минимально искажает G4-структуру и поэтому может быть использовано как структурный зонд. Под воздействием синего света ZnP1 окисляет азотистое основание гуанин, участвующее в образовании G4-структуры. Окисление гуанина до 8-оксогуанина и других производных приводит к разрушению хугстиновской связи между двумя основаниями, участвующими в образовании квартета (рис. 1*б*), что нарушает его структуру и снижает стабильность. Это приводит к конформационному переходу G-квадруплекса в двойную спираль ДНК, как показано на олигонуклеотидных моделях с одной G4-структурой в дуплексе [13]. Учитывая эти свойства, мы выбра-

**Таблица 1.** Последовательности праймеров

Ген	Праймеры для амплификации <sup>a</sup> , 5'→3'	Флуоресцентно меченные праймеры <sup>b</sup> , 5'→3'
<i>MYC</i>	Forward: GAGGAGCAGCAGAGAAAGGG Reverse: TCCCTCCGTTCTTTTCCCG	FAM-TCCTAGAGCTAGAGTGCTCGG
<i>TERT</i>	Forward: GGCCGATTCGACCTCTCT Reverse: CAGCGCTGCCTGAAACTC	FAM-CTTCCAGCTCCGCCTCTCC

<sup>a</sup>Forward – прямой праймер; Reverse – обратный праймер.

<sup>b</sup>FAM – флуоресцен.

ли соединение ZnP1 с высоким окислительным потенциалом, большой избирательностью связывания, при этом минимально искажающим структуру ДНК [10, 12, 14].

В представленной работе мы исследовали длинные участки (~400 п.н.) промоторов двух генов человека: *MYC* и *TERT*. В их состав входит несколько последовательностей, потенциально образующих G4-структуры. Для промотора *TERT* в литературе описаны модели, предполагающие формирование трех следующих друг за другом параллельных квадруплексов [15–17]. Для промотора *MYC* человека также известно несколько G4-структур, описанных в литературе [18–20].

Таким образом, целью данной работы было определение положения G4-структур, образующихся в контексте двойной спирали ДНК, в участках промоторов *MYC* и *TERT*. С помощью производного порфирина ZnP1 мы провели специфическое окисление гуанинов G4-структур и установили локализацию окисленных форм гуанинов методом удлинения праймера.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Олигонуклеотиды.** 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.** Амплификацию проводили по ранее описанной методике [11]. Стандартный буфер для проведения ПЦР был заменен на не содержащий ионы калия – для снижения стабильности потенциальных G4-структур в матричной цепи ДНК.

**Очистка ПЦР-продуктов.** К реакционной смеси объемом 50 мкл добавляли 200 мкл 0.3 М ацетата натрия (рН 5.3) и 600 мкл 96%-ного этанола и оставляли при –20°C на 30 мин, после чего осадок отделяли центрифугированием при 14000 × g в течение 10 мин. После промывания 70%-ным этанолом образцы растворяли в воде. Для удаления праймеров использовали набор магнитных частиц CleanMag DNA (ЗАО “Евроген”) в соответствии с рекомендациями фирмы-производите-

ля. Концентрацию очищенных образцов ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США) при длине волны 260 нм.

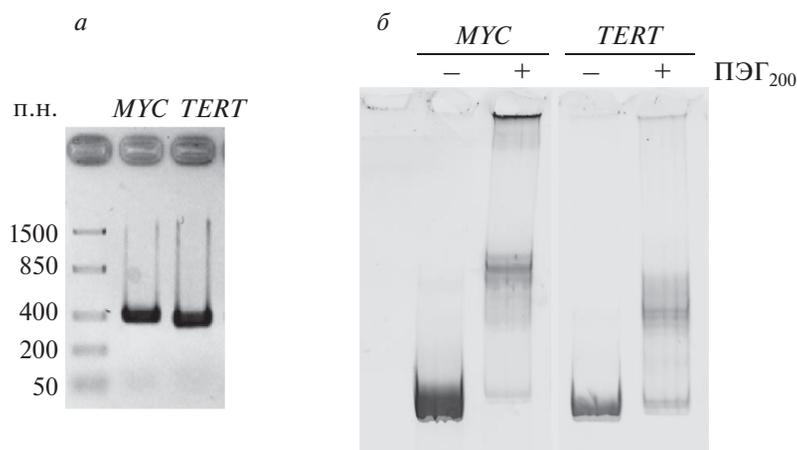
**Формирование G4-структур.** Полученные ПЦР-продукты в концентрации 10 нМ отжигали (нагревали 5 мин при 95°C и медленно охлаждали при комнатной температуре в течение 12 ч) в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7.8), содержащем 100 мМ KCl и 40% ПЭГ<sub>200</sub>. Формирование квадруплексов в полученных образцах регистрировали по изменению электрофоретической подвижности в 8%-ном ПААГ.

**Фотоиндуцируемое разрушение G4-структур.** Порфирин ZnP1 (рис. 1а) был получен по ранее описанной методике [12, 21]. После отжига к образцам добавляли порфирин ZnP1 до конечной концентрации 1 мкМ, облучали синим светом (465 нм) в течение 5 мин для специфического окисления гуаниновых оснований, образующих G4-структуру. Анализ окисленных G-квадруплексных структур проводили в нативном 8%-ном ПААГ. Гель окрашивали красителем SYBR Gold (“Invitrogen”, США) и визуализировали на флуоресцентном сканере Typhoon 9500 (“GE Healthcare”, США).

**Внесение одонитевых разрывов в местах окисленных форм гуанина.** К облученному образцу объемом 25 мкл добавляли 1 U формамидопиримидин-ДНК-N-гликозилазы (Fpg) *Escherichia coli* (“NEB”, США), 1× NEB buffer1 и инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали прогреванием при 70°C в течение 10 мин. ДНК осаждали спиртом (как написано выше) и растворяли в 5 мкл воды.

**Удлинение флуоресцентно меченного праймера.** Реакцию удлинения праймера проводили в 25 мкл смеси, содержащей 20 мМ Трис-HCl (рН 9.5), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5% DMSO, 20 мМ CsCl, 0.1 мМ dNTPs, 0.5 U SNPdetect-полимеразы (ЗАО “Евроген”), 5 мкл ДНК-матрицы, 100 нМ флуоресцентно меченный праймер.

Реакционная смесь для секвенирования по Сэнгеру (25 мкл) содержала те же компоненты и 2 нМ ПЦР-продукт в качестве ДНК-матрицы.



**Рис. 2.** Электрофоретическая подвижность изучаемых образцов. *a* – ПЦР-продукт *MYC* (401 п.н.) и *TERT* (378 п.н.). *б* – Отжиг ПЦР-продуктов *MYC* и *TERT* в присутствии ПЭГ<sub>200</sub>.

В реакционную смесь вносили ddG, ddA, ddT или ddC до конечной концентрации 0.1, 0.1, 0.1 и 0.01 мкМ соответственно. Полученные реакционные смеси инкубировали при 95°C в течение 3 мин, а затем проводили 20 циклов амплификации: денатурация 30 с при 95°C, отжиг в течение 30 с, удлинение праймера при 72°C в течение 60 с. Температуру отжига подбирали для каждого праймера с помощью программы OligoAnalyzer Tool ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) и корректировали опытным путем.

По окончании реакции в каждую смесь вносили по 200 мкл 0.3 М ацетата натрия (рН 5.3) и 600 мкл 96%-ного этанола и оставляли при –20°C на 30 мин, после чего осадок отделяли центрифугированием при 14000 × *g* в течение 10 мин. Осадок промывали 70%-ным спиртом, сушили при комнатной температуре и растворяли в буфере, содержащем 30 мМ Na-фосфат (рН 7.8), 80% формамида, 0.025% бромфенолового синего и 0.025% ксиленцианола. Денатурацию проводили при 95°C в течение 5 мин и наносили смесь на 10%-ный ПААГ, содержащий 7 М мочевины и 1× ТВЕ-буфер. Гель анализировали на флуоресцентном сканере Turphoon 9500 (“GE Healthcare”). Для построения денситометрических профилей использовали программу ImageJ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Формирование квадруплексных структур в протяженной дцДНК

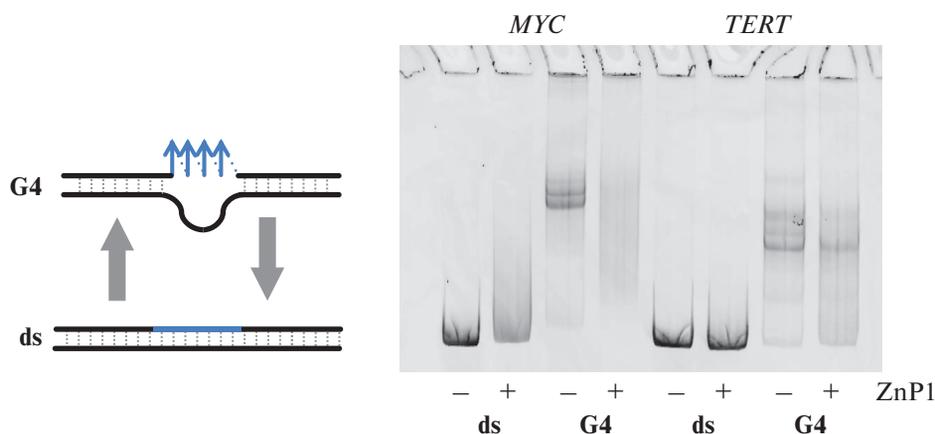
Для изучения G4-структур в протяженной дцДНК мы выбрали промоторные участки онкогенов человека *MYC* и *TERT*, содержащие последовательности, потенциально способные образовывать квадруплексы. Объектом исследования служили фрагменты длиной 401 п.н. (*MYC*) и

378 п.н. (*TERT*), полученные ПЦР-амплификацией с геномной ДНК человека (рис. 2*a*). Участки ДНК были выбраны так, чтобы положение потенциальных G4-структур приходилось на центральную часть двойной спирали и исключало краевые эффекты от конформационных перестроек ДНК при формировании квадруплекса. Амплификацию проводили в условиях, подобранных в работе Г. Чащиной (G. Chashchina) и соавт. [11], в которой было показано, что ионы калия в стандартных буферах термофильных полимераз затрудняют синтез участков ДНК, матричная нить которых содержит потенциальные G4-последовательности.

ПЦР-продукты всегда представляют собой дцДНК независимо от наличия или отсутствия квадруплексных участков вследствие последовательного синтеза с образованием классических пар Уотсона–Крика. Для формирования альтернативных структур в дцДНК необходимо преодолеть энергетический и кинетический барьер конформационного перехода, что предполагает расплетание двойной спирали.

Для имитации клеточных условий часто используют инертные наполнители, например фикоколл, декстран или ПЭГ. Последний имитирует клеточную среду, так называемые условия “молекулярной скученности”. При количественном анализе влияния молекулярной скученности на термодинамику образования G-квадруплексов было показано, что G4-структура стабилизируется в условиях молекулярного скопления. Это коррелирует с понижением активности воды и, как следствие, приводит к дестабилизации двойной спирали ДНК, образованной парами Уотсона–Крика [22].

Zheng с соавт. [23] показали, что отжиг G4-последовательностей в составе двойной спирали в присутствии ПЭГ<sub>200</sub> индуцирует образование



**Рис. 3.** Отжиг ПЦР-продуктов промоторных областей *MYC* (401 п.н.) и *TERT* (378 п.н.) в присутствии ПЭГ<sub>200</sub> (а) и последующее окисление полученных дцДНК (ds) порфирином ZnP1 (б).

квадруплексов в контексте дцДНК. В условиях молекулярной скученности G-квадруплексы не только образуются, но и сохраняют стабильную структуру [23].

Ранее нами предложен альтернативный способ формирования G4-структуры в дуплексе, основанный на стабилизации лигандом пиридоластина (PDS) [13]. Благодаря планарной структуре PDS преимущественно связывается с крайними гуаниновыми квартетами, приводя к значительной стабилизации G4 [24]. PDS обладает низкой аффинностью к двойной спирали ДНК и при связывании сдвигает энергетический баланс в сторону G4. Ранее нам удалось получить стабильные структуры G4 в дуплексе [13] и показать, что комплекс G4 с PDS в меньшей мере подвержен окислительному действию из-за стерических препятствий при связывании ZnP1, то есть PDS защищает гуанины от окисления. Таким образом, в данной работе для формирования G4-структур в составе промоторов двух онкогенов мы использовали отжиг в присутствии ПЭГ<sub>200</sub>.

Медленным отжигом в буфере, содержащем 100 мМ KCl и 40% ПЭГ<sub>200</sub>, были сформированы G4-структуры из очищенных протяженных дцДНК (ПЦР-продуктов). Образование альтернативного сворачивания дцДНК и образования G4-структуры детектировали по снижению электрофоретической подвижности в ПААГ относительно нативных ПЦР-продуктов (рис. 2б). Меньшая подвижность в геле соответствует образованию G4 в дуплексе [13, 23]. Для промоторного участка *MYC* обнаружено, что часть образца соответствует высокомолекулярному комплексу и находится вблизи лунки для нанесения образца. Возможная агрегация G4-структур, сформированных в дуплексе, ранее обсуждалась и была подтверждена методом атомно-силовой микроскопии [25]. Стоит отметить, что такая агрегация образца при от-

жиге не воспроизводится в нескольких повторах, хотя положение полосы с меньшей подвижностью относительно дуплекса воспроизводимо для образцов *MYC* и *TERT*, что может отражать различное количество и разные конформации G4-структур в составе дцДНК выбранных промоторных участков.

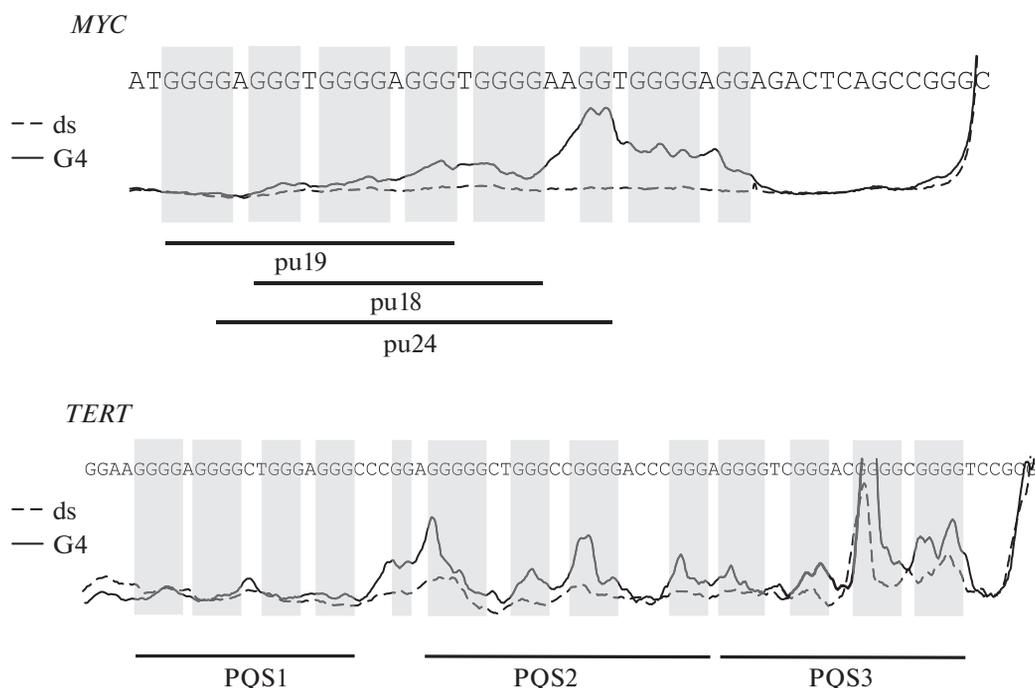
#### *Изменение конформации ДНК при фотоиндуцированном окислении G4-структур порфирином ZnP1*

Полученные отжигом G4-структуры инкубировали с порфирином ZnP1 и подвергали облучению синим светом. Анализ подвижности в ПААГ показал, что происходит частичное разрушение квадруплексной структуры, о чем свидетельствует уменьшение или размывание полосы с меньшей подвижностью относительно дцДНК (рис. 3). Этот эффект может быть объяснен дестабилизацией G4-структуры из-за окисления гуанина порфирином ZnP1. Эффект перехода G4 в двойную спираль оказался сильнее для последовательности промотора *MYC*, чем для *TERT*. Мы предполагаем, что это может быть связано с незначительной специфичностью ZnP1 к определенной последовательности, конформационным особенностям G4-структуры или недоступностью некоторых квадруплексов для взаимодействия с порфирином. Известно, что дцДНК подвержена окислению ZnP1 в меньшей степени, чем квадруплекс, — аналогично тем случаям, которые наблюдались на коротких олигонуклеотидах [10, 13].

#### *Определение позиции окисленных форм гуанина в нуклеотидной последовательности*

Важный аспект в исследовании конформации ДНК посредством таргетного окисления G4-структур — обнаружение образующихся





**Рис. 5.** Денситометрический профиль позиций, на которых останавливается ДНК-полимераза при удлинении праймера, отнесенный к нуклеотидным последовательностям *MYC* и *TERT*. Известные G4-последовательности с подтвержденными структурами квадруплексов [16, 20] показаны черными линиями.

равновесии между параллельной и 3+1 конформацией G4. R. Mosen и соавт. [16] предложили модель формирования G4-структур промоторной последовательности гена *TERT*. Используя ряд биофизических методов, авторы показали, что эти структуры образованы тремя взаимодействующими друг с другом квадруплексами. При анализе позиций окисленных форм гуанина в сформированной G4-структуре выявили, что наиболее эффективно окисление происходит на 5'-нуклеотидах подряд идущих гуанинов, которые входят в состав последовательности PQS2 (рис. 5). Такая локализация окисленных оснований соответствует формированию G4-структуры с параллельной ориентацией гуаниновых участков, что соотносится с предложенной ранее структурой участка PQS2 из промоторной области гена *TERT* [14].

Используя порфилин ZnP1 для окисления гуанинов в составе квадруплексов, мы подтвердили возможность образования, по крайней мере, одной доступной для окисления G4-структуры – PQS2 – в промоторе гена *TERT*. Именно эта область промотора наиболее подвержена мутациям C → T или G → A [26], что позволяет предположить участие окисления G4-структур в появлении мутаций в промоторных областях.

Нами продемонстрирована возможность идентификации G4-структур в протяженной дцДНК

при помощи отжига в присутствии ПЭГ<sub>200</sub> и ионов калия. Впервые показана возможность окислительного действия порфирина ZnP1 на G4-структуры, образующиеся в участках промоторов генов *MYC* и *TERT*. Методом удлинения праймера определена локализация окисленных форм гуанина. Позиции окисленных форм гуанина в промоторе гена *TERT* соответствуют ранее изученным G4-структурам. В длинных природных последовательностях дцДНК возможно альтернативное сворачивание G4-структур, вызванное наличием комплементарной нити и дополнительных повторов гуанина, что было показано на примере промотора гена *MYC*.

Обнаруженные сайты окисления ДНК могут быть использованы для интерпретации регуляторной роли изменения конформации ДНК и выбора альтернативных модельных структур ДНК при разработке новых фотосенсибилизаторов для направленного действия на G4-структуры промоторов онкогенов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-14-00332).

Статья не содержит экспериментов, включающих людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Besnard E., Babled A., Lapasset L., Milhavet O., Parinello H., Dantec C., Marin J.M., Lemaitre J.M. (2012) Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 837–844.
- 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**, 11593–11598.
- Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S. (2020) The structure and function of DNA G-quadruplexes. *Trends Chem.* **2**, 123–136.
- Marsico G., Chambers V.S., Sahakyan A.B., McCauley P., Boutell J.M., Antonio M.D., Balasubramanian S. (2019) Whole genome experimental maps of DNA G-quadruplexes in multiple species. *Nucleic Acids Res.* **47**, 3862–3874.
- Chambers V.S., Marsico G., Boutell J.M., Di Antonio M., Smith G.P., Balasubramanian S. (2015) High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat. Biotechnol.* **33**, 877–881.
- Miskiewicz J., Sarzynska J., Szachniuk M. (2021) How bioinformatics resources work with G4 RNAs. *Brief. Bioinformatics.* **22**, bbaa201.
- Grün J.T., Schwalbe H. (2022) Folding dynamics of polymorphic G-quadruplex structures. *Biopolymers.* **113**, e23477.
- Sun D., Hurley L.H. (2010) Biochemical techniques for the characterization of G-quadruplex structures: EMSA, DMS footprinting, and DNA polymerase stop assay. *Methods Mol. Biol.* **608**, 65–79.
- Guo J.U., Bartel D.P. (2016) RNA G-quadruplexes are globally unfolded in eukaryotic cells and depleted in bacteria. *Science.* **353**(6306), aaf5371.
- Benjaminov A.D., Novikov R.A., Mamaeva O.K., Mitkevich V.A., Smirnov I.P., Livshits M.A., Shchyolkina A.K., Kaluzhny D.N. (2016) Light-induced oxidation of the telomeric G4 DNA in complex with Zn(II) tetracarboxymethyl porphyrin. *Nucleic Acids Res.* **44**, 10031–10041.
- Chashchina G.V., Benjaminov A.D., Kaluzhny D.N. (2019) Stable G-quadruplex structures of oncogene promoters induce potassium-dependent stops of thermostable DNA polymerase. *Biochemistry (Moscow).* **84**, 562–569.
- Kovaleva O.A., Tsvetkov V.B., Mamaeva O.K., Ol'shevskaya V.A., Makarenkov A.V., Dezhenkova L.G., Semeikin A.S., Borisova O.F., Shtil A.A., Shchyolkina A.K., Kaluzhny D.N. (2014) Preferential DNA photocleavage potency of Zn(II) over Ni(II) derivatives of carboxymethyl tetracationic porphyrin: the role of the mode of binding to DNA. *Eur. Biophys. J.* **43**, 545–554.
- Benjaminov A., Chashchina G., Shchyolkina A., Kaluzhny D. (2021) Oxidative probing of the G4 DNA structure induced in double-stranded DNA by molecular crowding or pyridostatin. *Biochimie.* **191**, 33–36.
- Benjaminov A., Shchyolkina A., Kaluzhny D. (2019) Conformational features of intramolecular G4-DNA constrained by single-nucleotide loops. *Biochimie.* **160**, 122–128.
- Chaires J.B., Trent J.O., Gray R.D., Dean W.L., Buscaglia R., Thomas S.D., Miller D.M. (2014) An improved model for the *hTERT* promoter quadruplex. *PLoS One.* **9**, e115580.
- Monsen R.C., DeLeeuw L., Dean W.L., Gray R.D., Sabo T.M., Chakravarthy S., Chaires J.B., Trent J.O. (2020) The *hTERT* core promoter forms three parallel G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **48**, 5720–5734.
- Lim K.W., Lacroix L., Yue D.J.E., Lim J.K.C., Lim J.M.W., Phan A.T. (2010) Coexistence of two distinct G-quadruplex conformations in the *hTERT* promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12331–12342.
- Ambrus A., Chen D., Dai J., Jones R.A., Yang D. (2005) Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human *c-MYC* promoter. Implications for G-quadruplex stabilization. *Biochemistry.* **44**, 2048–2058.
- Phan A.T., Modi Y.S., Patel D.J. (2004) Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human *c-myc* promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8710–8716.
- Phan A.T., Kuryavyi V., Gaw H.Y., Patel D.J. (2005) Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human *MYC* promoter. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 167–173.
- Arutyunyan A.F., Tevonyan L.L., Benjaminov A.D., Yegorov Y.E., Kaluzhny D.N. (2021) The phototoxic effect of water-soluble porphyrins on human clear cell renal cell carcinoma line Caki-1. *Biophysics.* **66**, 273–277.
- Miyoshi D., Karimata H., Sugimoto N. (2006) Hydration regulates thermodynamics of G-quadruplex formation under molecular crowding conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7957–7963.
- Zheng K.W., Chen Z., Hao Y.H., Tan Z. (2010) Molecular crowding creates an essential environment for the formation of stable G-quadruplexes in long double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* **38**, 327–338.
- Liu L.-Y., Ma T.-Z., Zeng Y.-L., Liu W., Mao Z.-W. (2022) Structural basis of pyridostatin and its derivatives specifically binding to G-quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 11878–11887.
- Severov V., Tsvetkov V., Barinov N., Babenko V., Klinov D., Pozmogova G. (2022) Spontaneous DNA synapsis by forming noncanonical intermolecular structures. *Polymers.* **14**, 2118.
- Hasanau T., Pisarev E., Kisil O., Nonoguchi N., Le Calvez-Kelm F., Zvereva M. (2022) Detection of *TERT* promoter mutations as a prognostic biomarker in gliomas: methodology, prospects, and advances. *Bio-medicines.* **10**, 728.

## Oxidative Probing of the G4 DNA Structure by ZnP1 Porphyrin within Sequences of *MYC* and *TERT* Promoters

G. V. Chashchina<sup>1</sup> and D. N. Kaluzhny<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

\**e-mail: uzhny@mail.ru*

The formation of G4 structures in a DNA double helix competes with the complementary strand, which can change the equilibrium G4 structures studied on single-strand models by classical structural methods. A relevant task is to develop methods for detecting and localizing G4 in extended double-stranded (ds) DNA in the promoter regions of the genome. The porphyrin derivative ZnP1 selectively binds and leads to photo-induced oxidation of guanine in G4 structures on single-stranded (ss) and dsDNA model systems. In this research, we show the oxidative effect of ZnP1 on native sequences of *MYC* and *TERT* oncogene promoters that potentially capable to form G4 structures. Single strand breaks in the guanine rich sequence caused by ZnP1 oxidation and subsequent cleavage of the DNA strand by Fpg glycosylase were identified and assigned to the nucleotide sequence. The detected break sites corresponded to sequences potentially capable of forming G4 structures. New data were obtained on the possibility of folding G4 structures in the presence of a complementary strand in the context of the DNA double helix of the natural sequence.

**Keywords:** G-quadruplexes, porphyrin, photosensibilisation, DNA oxidation