

СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСОВ ДНК И РНК. ВЗГЛЯД ЧЕРЕЗ 50 ЛЕТ ПОСЛЕ ИХ ОТКРЫТИЯ

©2016 г. Н. Г. ДОЛИННАЯ¹, А. М. ОГЛОБЛИНА²,
М. Г. ЯКУБОВСКАЯ²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва

² Институт канцерогенеза, Российский онкологический научный
центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

I. Введение. II. Структурные особенности G-квадруплексов нуклеиновых кислот и факторы, влияющие на их стабильность и конформационное разнообразие. III. Локализация последовательностей, способных образовывать G-квадруплексы, в геномах и транскриптоматах разных организмов. IV. Методы, используемые для характеристики G4 *in vitro*; термодинамика и кинетика сборки–разрушения квадруплексов. V. Факторы, влияющие на равновесие: ДНК–дуплекс–G-квадруплекс–i-мотив. VI. Структурная организация мультиквадруплексных систем, образованных последовательностями НК с множественными G-трактами. VII. Низкомолекулярные лиганды и белки, узнающие и специфически связывающие G4. VIII. Полиморфизм теломерных G-квадруплексов. IX. G-квадруплексы, образующиеся в промоторных участках генов эукариот. X. Структурные особенности РНК-квадруплексов и их биологическая роль. XI. Гибридные ДНК–РНК G-квадруплексы. XII. Идентификация ДНК- и РНК-квадруплексов в культурах клеток и в системах *in vivo*. XIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Неканонические структуры ДНК, которые образуются путем конформационной перестройки двуспиральных участков генома с определенной нуклеотидной последовательностью, рассматриваются в настоящее время как сеть новых регуляторных элементов. Одной из наиболее удивительных и активно изучаемых неканонических форм ДНК являются четырехспиральные G-богатые структуры, так называемые G-квадруплексы (G4). Открытые более половины столетия назад, эти неканонические структуры прошли в научном

Адрес для корреспонденции: dolinnaya@hotmail.com

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-04-00575_A).

сознании путь от занятого феномена гелей гуанозина в пробирке до важного структурного элемента генома. Сейчас объектом интенсивных исследований стали G4, образованные молекулами РНК [1, 2].

Последовательности нуклеиновых кислот, образующие G4 (G4-мотивы), найдены в G-богатых повторах эукариотических геномов, таких как теломерные ДНК, микро- и минисателлитные последовательности, а также в регуляторных участках геномов, в частности, в промоторах онкогенов. С помощью новых методических подходов получены данные, свидетельствующие о том, что G4 играют важную роль в регуляции ключевых клеточных процессов [3, 4], таких как репликация [5, 6], защита хромосомных концов [7], транскрипция [8], мутагенез [9], репарация геномных повреждений [10], рекомбинация ДНК [11] и эпигенетические процессы [12, 13], а также посттранскрипционные события: трансляция [14], сплайсинг РНК, альтернативное полиаденилирование мРНК [15] и др.

Различным аспектам образования G4, их топологии, факторам, влияющим на стабильность и полиморфизм таких структур, взаимодействию G4 с низкомолекулярными лигандами и др. посвящен ряд обзоров и даже книг [3, 16–18]. Однако, в последнюю декаду число публикаций, касающихся исследования таких неканонических форм, неуклонно росло, что связано, главным образом, с прогрессом в изучении их биологических функций. Интерес к G4 обусловлен также тем, что их формирование ассоциировано с широко распространенными болезнями человека (онкологические, сердечно-сосудистые заболевания, диабет, нейродегенеративные расстройства) [19, 20]. В последние годы G4 активно используются как компоненты наноструктур и недорогие переключающие устройства с потенциалом применения в нанотехнологии и биологии [21–23].

В отличие от существующих обзорных статей, в которых затрагивались частные вопросы, связанные с G4, в настоящем обзоре освещены все аспекты квадруплексной проблематики. В нем проанализированы данные публикаций последних лет, которые существенно изменили научные взгляды на структурный полиморфизм G-квадруплексов, термодинамику и кинетику их образования–разрушения, на факторы, влияющие на равновесие между ДНК-дуплексами и неканоническими четырехспиральными формами ДНК, на структурную организацию мультиквадруплексных систем. Кроме этих аспектов в обзоре обобщена новая информация о структуре и устойчивости G4 в теломерных ДНК и промоторах онкогенов, о конформационных особенностях рибонуклеотидных G4 и гибридных ДНК–РНК-квадруплексов, суммированы данные о разных классах лигандов, узнаю-

щих G-квадруплексы, о G4-специфичных белках и антителах, о существовании G4 в системах *in vivo*. Мы попытались сделать срез современного состояния науки о квадруплексах нуклеиновых кислот, включив краткую историю развития взглядов на их структуру и свойства. Особое внимание уделено новым экспериментальным подходам, с помощью которых осуществлен прорыв в изучении G4 и их визуализации в биологических объектах.

II. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ G-КВАДРУПЛЕКСОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИХ СТАБИЛЬНОСТЬ И КОНФОРМАЦИОННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

G4 образуются путем внутри- или межмолекулярных взаимодействий молекул ДНК или РНК, содержащих тракты oligoG (G-тракты). Центральная часть (кор) квадруплекса состоит из G-тетрад, в которых четыре остатка гуанина из разных цепей или разных G-трактов (в случае внутримолекулярных G4) соединены системой Хугстиновских водородных связей (точнее, H-связей, в образовании которых принимают участие Уотсон-Криковские и Хугстиновские стороны гетероциклических оснований). Стэкинг-взаимодействия плоских G-тетрад, а также дополнительные взаимодействия элементов сахаро-фосфатного остова [24] формируют специфическую структуру G4 (рис. 1). Следует заметить, что элементы квадруплексов образуются даже при самоассоциации гуанозинмонофосфатов. Это связано с особыми свойствами остатков гуанина, которые обладают набором стерически соответствующих электронодонорных и электроноакцепторных центров и повышенной способностью к стэкинг-взаимодействиям.

В исследованиях *in vitro* G4 образовывались в результате межмолекулярных взаимодействий двух, трех или четырех олигонуклеотидных молекул, содержащих G-тракты, а также за счет внутримолекулярного сворачивания одного олигонуклеотида (рис. 1а). Нуклеотидную последовательность, способную сложиться внутримолекулярно в G-квадруплекс, обычно определяют как $G_{2-5}L^1G_{2-5}L^2G_{2-5}L^3G_{2-5}$, где G_{2-5} – G-тракты, которые содержат от 2 до 5 идущих подряд остатков гуанозина, L^n – нуклеотидные последовательности, соединяющие эти тракты. До недавнего времени кор квадруплекса рассматривали как несколько G-тетрад, правозакрученных друг относительно друга [16]. И только в 2015 году методами РСА и ЯМР-спектроскопии был зарегистрирован левозакрученный G4 – квадруплексный аналог Z-ДНК, образованный при внутримолекулярном складывании олигонуклео-

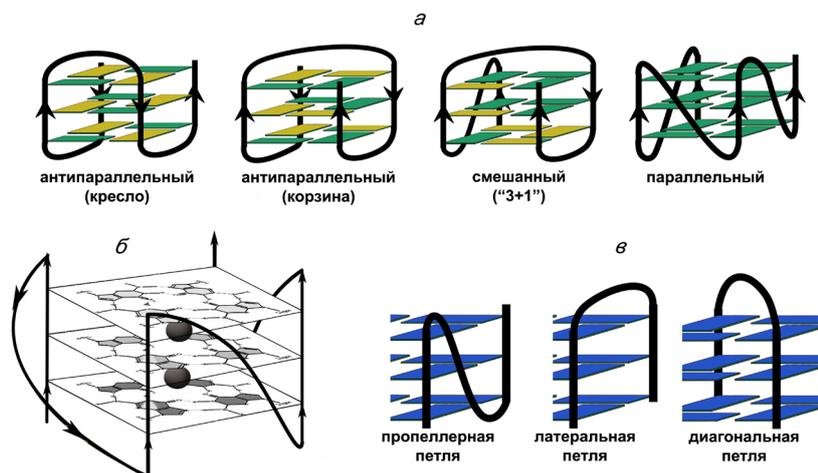


Рис. 1. Схематическое изображение внутримолекулярных G4, различающихся ориентацией цепей в квадруплексном коре; желтым цветом обозначены гуанозины в *син*-конформации, зеленым цветом – в *анти*-конформации (а). Параллельный G4, в котором приведена структура G-тетрад и участки связывания ионов калия (черные кружки) (б). Типы петель в квадруплексе, которые соединяют G-тракты (в).

тида $d(T(GGT)_4TG(TGG)_3TGTT)$ в условиях, близких к физиологическим [25].

Для ДНК G4 характерно большое структурное разнообразие, обусловленное такими факторами, как количество формирующих их молекул, длина G-трактов, взаимная ориентация цепей, нуклеотидная последовательность (состав) и длина петель, наличие нуклеотидных фрагментов, фланкирующих G4-мотив, природа катиона в среде и др. [26]. Ориентация цепей, определяющая топологическую классификацию G-квадруплексных структур, может быть параллельной, антипараллельной, в которой две из четырех цепей идут в одинаковом направлении (выделяют два вида, «кресло» и «корзина», отличающиеся типом петель) или смешанной антипараллельной–параллельной (3+1); в последнем случае три цепи квадруплекса идут в одинаковом направлении (рис. 1а). Классификация углов закручивания гуаниновых тетрад в G4 разной топологии приведена в работе [27]. Петли, хотя и не участвуют в формировании G-тетрад, являются элементами вторичной структуры и основным источником напряжений и ограничений в структуре квадруплекса. Для G4 характерны три типа петель (рис. 1в): пропеллерные, соединяющие G-тракты,

которые формируют соседние ребра четырехспирального кора (условно их можно определить как петли, соединяющие «верхнюю» и «нижнюю» G-тетрады); при этом не происходит инверсии направления цепи нуклеиновой кислоты; латеральные (боковые) петли, соединяющие соседние G-тракты (направление цепи меняется); диагональные петли, соединяющие G-тракты, которые формируют противоположные ребра G-квадруплекса (направление цепи меняется). Формирование того или иного типа петель зависит от числа G-тетрад, количества нуклеотидных звеньев между G-трактами и их состава и непосредственно связано с ориентацией цепей в квадруплексе.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ КООРДИНАЦИЯ ОДНО-
И ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В ПОЛОСТИ G4
КАК ФАКТОР СТАБИЛИЗАЦИИ ТАКИХ НЕКАНОНИЧЕСКИХ ФОРМ НК

Поскольку G-квадруплексы образуются за счет ассоциации четырёх поли(олиго)анионов, важнейшим фактором их стабильности являются электростатические взаимодействия. Однако ионы, сконденсированные вокруг спирали и нейтрализующие заряды фосфатных групп сахарофосфатного остова, вносят незначительный вклад в формирование G4 [28]. В отличие от других типов структурированных нуклеиновых кислот G4 специфически связывают (координируют) ионы одно- и двухвалентных металлов внутри полости, образованной электроотрицательными карбонильными группами остатков гуанина [29]; при этом катионы теряют свою гидратную оболочку. Поэтому важной детерминантой, обеспечивающей способность ионов металлов стабилизировать G-квадруплексы, является их ионный радиус. Информация о локализации катионов в квадруплексной структуре и о динамике их связывания с ДНК получена методами ЯМР-спектроскопии и РСА. С помощью молекулярного моделирования был проанализирован механизм миграции катиона в центральную полость G-квадруплекса; показано, что миграция в основном осуществляется через концевые G-тетрады и на нее активно влияют петли квадруплекса. Локализация катионов внутри квадруплексной структуры зависит от размера и заряда катиона. При попадании катиона внутрь квадруплексного кора расстояние между оксо-группами остатков гуанина в G-тетраде уменьшается из-за электростатического притяжения к катиону, что предотвращает выход иона металла в раствор [30].

Максимальный стабилизирующий эффект среди одновалентных катионов наблюдается для ионов K^+ , которые располагаются между G-тетрадами, образуя 8 координационных связей с карбонильными

группами гуанина (рис. 1б). Другими сайтами связывания ионов калия являются полости между латеральной или диагональной петлями квадруплекса и концевой G-тетрадой [30]. Менее выраженное стабилизирующее действие оказывают ионы Na^+ , которые, как правило, локализуются в плоскости тетрады и образует 4 координационные связи с остатками гуанина [31]. Кроме ионного радиуса фактором, объясняющим различное влияние K^+ и Na^+ на стабильность G4, является разница в свободной энергии гидратации ионов.

Для определения сайтов координации одновалентных ионов с ДНК-квадруплексами в качестве ЯМР-проб были использованы ионы аммония. Показано, что NH_4^+ могут быть локализованы внутри квадруплекса между соседними G-тетрадами, как ионы калия [32]. Согласно другим данным [33], ионы аммония слишком большие для того, чтобы входить во внутреннюю полость квадруплекса без частичного раскрытия G-тетрад. Поэтому тип связывания этих ионов с G4 зависит от диктуемой температурой жесткости четырехспиральной структуры и контролируется стерическими ограничениями G-тетрад и структурой петель [33]. Методом ЯМР-спектроскопии показано, что ионы таллия и рубидия координированы внутри G-квадруплексной структуры, как и K^+ . С ростом концентрации одновалентных ионов в среде увеличивается термодинамическая устойчивость G4 [34, 35]. Следует отметить, что ионы Li^+ и Cs^+ практически не стабилизируют четырехцепочечную структуру ДНК, т.к. их ионный радиус либо не позволяет им войти в полость квадруплекса, либо (если он слишком мал) удержаться там, образовав координационные связи с остатками гуанина [28]. Как недавно показано, увеличение концентрации нестабилизирующих квадруплекс ионов (Cs^+ или иона триметиламмония) при постоянной концентрации K^+ может привести к разрушению G4; такой эффект не наблюдался ни для одной другой структуры ДНК [35].

На стабильность и конформационные переходы между различными формами G4 оказывают влияние и ионы двухвалентных металлов. Некоторые из них (Ba^{2+} , Sr^{2+}) имеют размер, который позволяет им входить в центральную полость квадруплексов [36] и стабилизировать G4 значительно сильнее, чем одновалентные ионы. Так, константа связывания внутримолекулярного антипараллельного G4 с катионом бария в 10 раз выше, чем с катионом калия [30, 37]. А выраженную стабилизирующую способность ионов стронция объясняют его сильным взаимодействием с карбонильными группами гуанинов и эффективным экранированием зарядов фосфатных групп [38]. Ионы Pb^{2+} тоже в значительной степени стабилизируют квадруплекс,

поскольку они, как показано методом РСА, располагаются между плоскостями соседних G-тетрад и могут замещать ионы K^+ и Na^+ в структуре квадруплекса. Сосуществовать в полости G4 могут также ионы Ca^{2+} и Na^+ , которые легко обмениваются друг на друга, так как их ионные радиусы близки. Зависимость квадруплекс-стабилизирующей способности ионов двухвалентных металлов от концентрации носит колоколообразный характер: 2–5 мМ растворы солей индуцируют сборку G4, а при концентрациях выше 10 мМ в сочетании с повышенной температурой некоторые ионы, Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и Mg^{2+} , могут вызвать диссоциацию квадруплекса. Причиной этого, как полагают, является специфическое взаимодействие ионов двухвалентных металлов с электроноакцепторными группами гуанина, отвечающими за образование Хугстиновских водородных связей. Сравнительное ранжирование степени стабилизации G4 одно- и двухвалентными катионами имеет следующий вид: $Sr^{2+} > Ba^{2+} > K^+ > Ca^{2+} > Na^+$, $NH_4^+ > Rb^+ > Mg^{2+} > Li^+ \geq Cs^+$ [22]. Ионы металлов, особенно двухвалентных, инициируют конформационные переходы между различными формами G4. Так, под действием ионов Ca^{2+} происходит конверсия антипараллельной топологии в параллельную [39]. Такой же эффект наблюдается для теломерных G4 при добавлении незначительного количества KCl в Na^+ -содержащий раствор, а при экстремально низкой концентрации ионов калия или стронция преобладающей формой является квадруплекс, который содержит только две G-тетрады, вместо обычно регистрируемой трехтетрадной структуры [22]. Согласно расчетным данным катион не является инициатором сборки квадруплекса, а стабилизирует уже сформированную структуру [30].

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ТОПОЛОГИЮ ДНК-КВАДРУПЛЕКСОВ

Одним из таких факторов является тип петель, соединяющих G-тракты, их длина и нуклеотидная последовательность [40–42]. Двух- или трехтетрадный G4 с тремя однонуклеотидными петлями имеет исключительно параллельную топологию, а все петли относятся к пропеллерному типу [43, 44]. В присутствии ионов K^+ для квадруплекса с двумя однонуклеотидными петлями характерна структура с параллельной ориентацией цепей независимо от длины и нуклеотидной последовательности третьей петли [26, 42, 45], тогда как в присутствии ионов Na^+ топология G-квадруплексов, образованных при складывании тех же олигонуклеотидов, гораздо более вариабельна и в большей степени зависит от нуклеотидной последовательности G4-мотива, чем в присутствии ионов K^+ [42].

G-квадруплекс с тремя динуклеотидными петлями может принимать и параллельную, и антипараллельную топологию, однако параллельная конформация в этом случае будет более энергетически выгодна [46]. Параллельный тип структур преобладает и в G4, одна из петель которого является моонуклеотидной. При этом природа нуклеотида (А, Т, G или С) в этой петле не влияет на топологию системы [42]. С помощью метода КД показано, что для библиотеки внутримолекулярных ДНК-квадруплексов с варьируемой длиной петля от одного до трех нуклеотидов топология G4 сдвигается от параллельной к антипараллельной или смешанной, когда общая длина всех петель превышает пять нуклеотидных единиц [26]. Тот факт, что пропеллерные петли содержат не более трех нуклеотидных звеньев [26], накладывает стерические ограничения на количество G-тетрад во внутримолекулярном квадруплексе (то есть, на его «высоту») [47, 48]. Необязательно число гуанозинов в G-тракте должно соответствовать числу G-тетрад [47]. Так, олигонуклеотид, в котором имеется G-тракт из 15-ти остатков гуанозина, образует, как было показано методом ЯМР-спектроскопии, параллельный внутримолекулярный G-квадруплекс, состоящий из трех G-тетрадных слоев и трех пропеллерных петель, образованных остатками гуанозина [48].

Тип складывания G4-мотива в квадруплексную структуру взаимосвязан с ориентацией основания и сахарного остатка в гуанозинах, формирующих квадруплексный кор; *син*- и *анти*-конформации различаются углом поворота основания вокруг N-гликозидной связи. Рассматривают четыре возможных набора конформаций в динуклеотидной последовательности GpG в составе G4: *син-анти*, *анти-анти*, *анти-син* и *син-син*. Они значительно различаются по своим энергетическим параметрам из-за разной геометрии стэкинг-контактов между гуанинами. В работе [49] дополнительно рассматривают 5'-концевые динуклеотидные последовательности GpG, которые принимают конформации *син-анти* и *син-син*. В этих димерах 5'-концевая гидроксильная группа образует H-связи с N3 гуанина в *син*-конформации. При параллельной ориентации всех четырех цепей в G4 все гуанозины находятся в *анти*-конформации, что является наиболее энергетически выгодным. В случае G4 других топологий *син-анти* конформация гуанозинов коррелирует со взаимной ориентацией цепей, меняясь и внутри G-тетрадного цикла, и вдоль оси квадруплекса (рис. 1а). На поверхности G4 находятся четыре бороздки, ширина которых (узкая, средняя и широкая) и распределение зарядов фосфатных групп в формирующих бороздки фрагментах сахарофосфатного остова зависят от топологии четырехцепочечных спиралей [50, 51]. Параллельный межмолекулярный квадруплекс

обладает четырьмя почти эквивалентными бороздками, по размеру совпадающими с малой бороздкой ДНК-дуплекса; в G4 с чередующимися конформациями *анти-син-анти-син* в каждой тетраде образуются две узких и две широких бороздки, в то время как в G4 с чередованием *анти-анти-син-син*-конформации в тетрадах формируется одна широкая, одна узкая и две средних бороздки.

Даже для квадруплексов, образованных за счет внутримолекулярного складывания одной цепи ДНК, разнообразие возможных конформаций очень велико, учитывая 26 комбинаций различных петель и 8 возможных видов G-тетрад, компоненты которых различаются взаимной ориентацией основания и сахарного остатка (*син-анти*) [52]. Образование межмолекулярных структур еще более увеличивает конформационное разнообразие G4. Дополнительные конформационные возможности возникают из-за включения в квадруплексный кор А-, С- или Т-тетрад, а также из-за образования на базе гуаниновых тетрад более сложных, стабилизированных Н-связями планарных пентад, гексад, гептад и октад [53, 54], содержащих разные типы оснований.

КВАДРУПЛЕКСНЫЕ АССОЦИАТЫ (ДИМЕРЫ)

Некоторые G4, главным образом параллельные, склонны к межквадруплексному взаимодействию [55]. Так, методом ЯМР-спектроскопии недавно было показано, что в растворе K^+ два внутримолекулярных параллельных G-квадруплекса слипаются за счет стэкинг-взаимодействия 5'-концевых G-тетрад (взаимодействие «тупыми» концами) [43, 56]. Описаны модели квадруплексной мультимеризации и за счет стэкинга 3'-3'- и 3'-5'-концевых G-тетрад [57]. Взаимодействовать могут как внутримолекулярные [43], так и межмолекулярные ДНК-квадруплексы, а контакт между субъединицами способен образовывать не только гуаниновые тетрады, но и имеющие большую гидрофобную поверхность гептады и октады [53, 54], содержащие кроме четырех остатков гуанина основания другой природы. Другой тип димерных ассоциатов G4 образуется по аналогии со сборкой ДНК-дуплексов с помощью «липких» концов. «Слипание» G-квадруплексов может происходить за счет того, что в образовании G-тетрады в участке контакта двух квадруплексных субъединиц участвуют остатки гуанозина из каждой субъединицы, как в случае межмолекулярного G4, образованного четырьмя молекулами олигонуклеотида d(GGGT). При образовании сцепленного димера G-тракты исходного G4 проскальзывают друг относительно друга. Дизайн исходных олигонуклеотидных конструкций для создания G-квадруплексных структур более высокого порядка описан в работе [58].

III. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, СПОСОБНЫХ ОБРАЗОВЫВАТЬ G-КВАДРУПЛЕКСЫ, В ГЕНОМАХ И ТРАНСКРИПТОМАХ РАЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Основная стратегия при анализе генома заключается в корректном определении того, какие нуклеотидные последовательности можно отнести к G4-мотивам. В качестве базовых рассматривают набор последовательностей, которые, как экспериментально установлено, образуют G4 [59]. В последнюю декаду в связи с ростом данных по секвенированию геномов млекопитающих и бактерий были разработаны алгоритмы поиска и маркирования G4-образующих последовательностей [60, 61]. Распределение G4-мотивов, подчиняющихся алгоритму QuadParser ($G_n L_{1-7} G_n L_{1-7} G_n L_{1-7} G_n$, где $n \geq 3$, $L = A, T(U), G, C$), в геномах различных организмов было объектом ряда исследований [62–64]. Показано, что G4-мотивами в основном обогащены геномы эукариотических организмов. Они распределены неравномерно, располагаясь преимущественно вне районов, вовлеченных в образование нуклеосом, и в неметилированных районах [65]. Высокая частота G4-мотивов наблюдается в теломерных ДНК [66] и микро(мини)сателлитных повторах [67, 68], в длинных концевых повторах ретротранспозонов [69], в генах рибосомных РНК, в регуляторных областях генома, в частности, в промоторах генов [70], причем преимущественно в кодирующей (смысловой) цепи [71], в точках начала репликации [5, 72, 73], участках, ответственных за перегруппировку генов иммуноглобулинов, участках повышенной ломкости хромосом [74], горячих точках рекомбинации [75], интронах генов [76, 77], островках CpG, энхансерах, инсуляторах [78], в митохондриальных ДНК [79], а также в различных областях транскриптома, включающих участки альтернативного процессинга мРНК, сплайсинга [80], 5'- и 3'-нетранслируемые районы мРНК [2], теломерные некодирующие РНК [81], пре-микроРНК [82], длинные некодирующие РНК [83].

Методами биоинформатического анализа показано, что G4-мотивы консервативны в различных эукариотических организмах [84]. Плотность G4-образующих последовательностей существенно выше в некодирующих районах по сравнению с кодирующими [85]. В человеческом геноме присутствует более 376000 G4-мотивов, согласующихся с алгоритмом QuadParser. Более 40% генов, кодирующих человеческие белки, содержат хотя бы один G4-мотив в промоторном районе [62]. В среднем плотность распределения этих последовательностей по геному человека составляет 0.153 на тысячу

пар оснований, в то время как их содержание в промоторных участках составляет 1.48. Максимум на кривой вероятностного распределения G4-мотивов в геномах человека, мыши, крысы, дрожжей, *E. coli* соответствует участку, находящемуся на расстоянии примерно 50 пар нуклеотидов от точки начала транскрипции. Вместе с тем, более 800 G4-мотивов локализованы в областях, удаленных на расстояние до 5000 нуклеотидных пар от точки начала транскрипции в 22049 генах человека [86, 87]. Тот факт, что последовательности, образующие G4, сохранились в ходе эволюции свидетельствует об участии этих неканонических форм ДНК в ключевых клеточных процессах [88]. В большей степени такими мотивами обогащены регуляторные районы генов теплокровных животных [80], а наибольшее их количество найдено в геноме человека. Причем присутствие G4-мотивов отмечено в равной степени в регуляторных участках ранних и поздних генов. В основном они предшествуют онкогенам и реже генам супрессоров опухолевых клеток [89]. G4-мотивы сопряжены в основном с генами, продукты которых отвечают за регуляторные функции, а не вовлечены в биосинтез белков «домашнего хозяйства». Сравнительным анализом *in silico* была выявлена гомология между G4-мотивами позвоночных и дрожжей в митохондриальных и ядерных геномах [85]. Интересно, что митохондриальная ДНК *S. cerevisiae* содержит на порядок больше G4-мотивов, чем ядерный геном [90]. В растениях квадруплекс-образующие последовательности, действующие как репрессоры трансляции, найдены в 5'-нетранслируемых участках мРНК [91]. Большое количество G4-мотивов содержат чрезвычайно распространенные в растениях длинные концевые повторы ретро-транспозонов [69].

ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫЕ И ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ G4-МОТИВЫ

В последние годы было выявлено множество последовательностей, в частности, в геноме человека, первичная структура которых отклоняется от алгоритма: $G_n L_{n-7} G_n L_{n-7} G_n L_{n-7} G_n$, где $n \geq 3$, $L = A, T(U), G, C$, но которые, тем не менее, образуют квадруплексные структуры [92]. Ложноотрицательным, например, является G4-мотив из минисателлитной ДНК, который складывается в квадруплекс с 9-нуклеотидной средней петлей [67]; доминирующий G4, образованный в промоторе гена *Vcl-2* человека, принимает параллельную топологию с 13-звенной петлей [87]. Согласно другим данным, средняя петля стабильного G4 может содержать до 21 нуклеотидного остатка [93]. Более того, недавно методом ЯМР-спектроскопии была показана возможность существования G4 разной топологии с единичными

или множественными выпетливаниями в квадруплексном коре (то есть с включениями в G-тракты нуклеотидных остатков другой природы). Эти выпетливания могут различаться длиной, нуклеотидным составом и местоположением [94]. Имеются также сообщения о ложноположительных G4-мотивах, которые подчиняются принятому алгоритму, но не образуют квадруплексов. Так, G-богатые последовательности в 5'-нетранслируемом участке мРНК человека были не способны складываться в квадруплекс из-за наличия C-трактов во фланкирующих участках, которые спаривались с G-трактами, образуя альтернативные вторичные структуры [14]. Для того, чтобы преодолеть эти ограничения, были выбраны другие, более общие критерии поиска G4-мотивов, например, учитывающие эффект соседних последовательностей, которые могут захватывать более широкие функциональные области геномов и транскриптомов [95, 96]. В работе 2016 г. разработан и протестирован алгоритм G4Hunter, который существенно отличается от ранее использованных инструментов предсказания вероятности образования G4 в определенной последовательности ДНК; он учитывает обогащенность последовательности остатками G и G/C-асимметрию между комплементарными цепями двойной спирали [97]. При обосновании этого алгоритма была проанализирована обширная база данных и экспериментально изучен потенциал образования квадруплексов фрагментами ДНК из митохондриального генома человека с помощью комбинации биофизических методов. Анализ геномов ряда организмов с применением разработанного алгоритма позволил заключить, что число последовательностей, способных образовывать стабильные G4 в человеческом геноме, значительно выше (в 2–10 раз), чем ранее оценивалось.

G4-МОТИВЫ НА КОНЦАХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ЛИНЕЙНЫХ ХРОМОСОМ (ТЕЛОМЕР)

Известно, что теломерные ДНК состоят из тандемно повторяющихся G·C-богатых некодирующих последовательностей, на 3'-конце которых находится 150–250-звенный одноцепочечный G-богатый участок. В человеческих клетках, как и в клетках всех позвоночных, теломерные ДНК представляют собой повтор (TTAGGG)/(CCCTAA) размером в несколько тысяч пар оснований. Подобные G·C-богатые повторы характерны для многих филогенетически отдаленных организмов; у насекомых типичная последовательность теломер содержит повтор (TTAGG)/(CCTAA), у растений – (TTTAGGG)/(CCCTAAA),

у *Tetrahymena* – (TTGGGG/CCCCAA), а у низших эукариот (реснитчатых) *Oxytricha nova* – (TTTTGGGG/CCCCAAAA).

G4-МОТИВЫ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ГЕНОМАХ

Распределение G4-мотивов в геномах этих организмов гораздо менее изучено. В геноме *E. coli* они тоже в основном сосредоточены в регуляторных районах, что позволяет предположить участие G4 в регуляции транскрипции [98]. Поиск G-квадруплексов и выяснение их функций в вирусных геномах фокусировались главным образом на ретровирусе ВИЧ. Локализация G4-мотивов вблизи горячих точек рекомбинации, центрального полипуринового тракта в 3'-конце гена *pol* и в длинных концевых повторах промотора вирусного генома указывает на участие G4 в процессах рекомбинации, репликации и регуляции промоторной активности ВИЧ-1 [99–101]. G4, образующиеся вблизи точки начала репликации ДНК-содержащего вируса Эпштейна-Барра, как полагают, играют важную роль в процессах вирусной репликации и присоединения к метафазной хромосоме [102]. Кроме того, недавно было показано, что кластеры G4 ответственны за регуляцию трансляции вирусной мРНК [103]. G4-мотивы, представленные в некодирующем регуляторе районе ДНК вируса SV40, оказались способны образовывать необычные структуры с C-тетрадой, интегрированной в квадруплексный кор. Предполагают, что эти квадруплексы играют важную роль в регуляции репликации, а также ранней и поздней транскрипции вирусного генома. Последовательности, образующие G4, и их потенциал складываться в квадруплексные структуры были проанализированы в геномах всех известных вирусов папилломы человека [104]. По крайней мере для некоторых из них обсуждается участие G4 в транскрипции, репликации и альтернативном сплайсинге, необходимом для производства вирусных белков. Роль G-квадруплексов в жизненном цикле вирусов, в частности, ВИЧ, а также применение G4-содержащих ДНК-аптамеров в качестве антивирусных агентов, дианоцикумов и инновационных инструментов обсуждается в работах [43, 105].

IV. МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ G4 *IN VITRO*; ТЕРМОДИНАМИКА И КИНЕТИКА СБОРКИ–РАЗРУШЕНИЯ КВАДРУПЛЕКСОВ

Для характеристики образующихся в определенном локусе G-квадруплексов каждый идентифицированный G4-мотив изучается *in vitro*, причем в различных экспериментальных условиях, в той или иной степени приближенным к внутриклеточным. Методы, которые обычно используют для описания топологии G4 и определения термодинамических и кинетических параметров образования и разрушения G-квадруплексных структур, включают КД [106, 107], УФ-спектроскопию [108, 109], дифференциальную сканирующую калориметрию [110, 111], гель-электрофорез [29, 52], PCA [25, 112], химический и ферментативный пробинг [101, 113, 114], флуоресцентную спектроскопию и резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) [34, 46, 115, 116], в том числе FRET в единичных молекулах [41, 117, 118], комбинационное рассеяние [119], электронный парамагнитный резонанс [120, 121], гидродинамические и хроматографические техники [52], молекулярную динамику (расчетные методы) [30, 122–124], масс-спектрометрию [125], ЯМР-спектроскопию [56, 126, 127]. Детальная характеристика ряда методов исследования G4 дана в работе [128].

В литературе имеется большой массив данных по термодинамике и кинетике образования G4, полученных с помощью традиционных подходов [128]. Однако эти аспекты, в отличие от структуры квадруплексов, не исследованы систематически. Не рассматривалась также взаимосвязь между термодинамической стабильностью, кинетикой и структурой G4. Обычно изучались термодинамические параметры сборки–диссоциации отдельных типов G4, причем разными методами [129]. На основании разрозненных данных разработан алгоритм предсказания стабильности квадруплексов [130]. Спонтанное складывание одноцепочечных последовательностей, содержащих G-тракты, в квадруплекс является термодинамически выгодным процессом [128]. В отличие от других неканонических структур, G-квадруплексы образуются в условиях, близких к физиологическим, и их температура плавления ($T_{пл}$) может превышать 70–80°C. Основная энергия стабилизации внутримолекулярных G4 обеспечивается сайт-специфическим связыванием ионов металлов в полости квадруплекса. Значения ΔG° и ΔH° образования внутримолекулярных G4 олигонуклеотидами длиной 22–26 звеньев (3–4 G-тетрады) в 100 мМ K^+ варьируют в диапазоне $-2 \div -8$ ккал/моль и $-30 \div -80$ ккал/моль, соответственно; устойчивость G-квадруплексов в растворе

Na^+ значительно ниже [31]. В отличие от G4, стабильность ДНК- и РНК-дуплексов не зависит от природы одновалентных катионов. Анализ полученных термодинамических данных показал, что внутримолекулярные G4 не являются более устойчивыми, чем другие внутримолекулярные комплексы НК [128]. В частности, ДНК-шпильки имеют гораздо более высокую $T_{\text{пл}}$, чем G4 сравнимой длины в одинаковых условиях [131]. Показано также, что в большинстве случаев энергии образования G4 недостаточно для того, чтобы разделить цепи двойной спирали (>20 пар оснований) во внутренних ДНК-сайтах, например, в промоторных районах [128]. Однако внутримолекулярному параллельному G4, образованному последовательностью $d((GGGT)_3GGG)$, приписывают особые свойства; складывание такой квадруплексной структуры является значительно более энергетически выгодным, чем образование ДНК-дуплекса в присутствии комплементарной цепи [132]. Более того, замена гуанозина в первом G-тракте (во второй позиции) на апуриновый сайт не препятствует складыванию аналогичной последовательности в G4, хотя и приводит к значительной дестабилизации структуры [133]. Методом молекулярной динамики показано, что вакантное место в образующейся G-триаде занимает молекула воды. Уникальный связывающий «карман» в G4 может быть использован как специфическая мишень для низкомолекулярных лигандов и метаболитов НК. Достаточно устойчивым является также G4, содержащий более чем один вакантный сайт (в одной или разных G-тетрадах) [134]. А G4 с единичным апуриновым сайтом могут образовывать и другие последовательности, в частности теломерные повторы человека [135]. Интересно, что «избыток» гуанозинов в некоторых G-трактах может приводить к их проскальзыванию друг относительно друга при образовании квадруплексных структур. Показано, что этот процесс стабилизирует свернутое состояние; за счет благоприятного изменения энтропии $T_{\text{пл}}$ G4 существенно возрастает [136].

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ОБРАЗОВАНИЯ–РАЗРУШЕНИЯ G4

К ним относятся: тип катиона, число взаимодействующих молекул, их первичная структура, длина G-трактов [109], присутствие нуклеотидных фрагментов, фланкирующих G4-мотив [137]. В частности, стабильность G4 сильно зависит от типа петель, их длины и нуклеотидного состава/последовательности [93, 138]. Замена даже одного основания в одно- или динуклеотидной петле квадруплекса

и в G4-фланкирующих фрагментах может влиять на стабильность G4 [42, 137, 139]. В частности, для параллельных G4 с петлями 1:3–9:1 замена T или C в однонуклеотидной петле на A приводит к значительной дестабилизации квадруплекса [42]; по данным ЯМР-спектроскопии остаток аденина в петле вытолкнут из бороздки G4, в отличие от остатка тимина, который лежит в бороздке квадруплекса [140]. Показано, что независимо от ориентации цепей ДНК термодинамическая стабильность внутримолекулярных G4 уменьшается с ростом длины петель [26, 93, 139]. Так, каждый дополнительный нуклеотид в пропеллерной петле приводит к падению $T_{пл}$ на 2°C [42, 93]. Проявление этой закономерности не связано с нуклеотидной последовательностью в петлях квадруплекса; это было показано с помощью набора трехтетрадных внутримолекулярных G4 с частично рандомизованной последовательностью петель [26]. Когда общая длина всех трех петель превышает 5 нуклеотидных остатков, дальнейшее ее увеличение уже незначительно влияет на термодинамическую стабильность квадруплексных структур. С другой стороны, H-связи или стэкинг-контакты в длинных петлях квадруплекса [141], а также стэкинг-взаимодействия оснований петли с концевыми G-тетрадами могут вносить благоприятный энтальпийный вклад в термодинамику образования G4. Стабильность G4 увеличивается и в случае, когда основания длинной петли могут спариваться с основаниями 5'-концевой последовательности, фланкирующей G4-мотив [142].

Известно, что образование G4 сопровождается высвобождением молекул воды [143]. Термодинамические вклады дегидратации и захвата протонированных G-квадруплексом оценены в работе [50]. Показано, что вода влияет на термодинамическую стабильность и полиморфизм G4 [110, 144]. Так, понижение ее активности, вызванное, например, добавлением в водный раствор различных спиртов или полиэтиленгликоля (ПЭГ), который используют для создания эффекта исключенного объема («молекулярной толкучки»), приводит к стабилизации квадруплекса [145]. Следует отметить, что эффект сольватации диаметрально противоположен для внутримолекулярного квадруплекса и двуспиральной ДНК; уменьшение активности воды дестабилизирует В-ДНК, но увеличивает устойчивость G4 [131]. Однако влияние ПЭГ, вызывающего дегидратацию квадруплекса, на стабильность G4 не так однозначно. Как было показано в статье 2016 г., этот реагент в присутствии ионов двухвалентных металлов стабилизирует только параллельные G4, но не оказывает влияния или даже дестабилизирует квадруплексы других топологий [143].

Согласно гипотезе авторов, ионы Sr^{2+} , Ba^{2+} и Pb^{2+} в некоторой степени компенсируют эффект обезвоживания, сопровождающий образование квадруплексной структуры, особенно в случае G4 с антипараллельной ориентацией цепей.

Наиболее полно и детально охарактеризованы термодинамика и кинетика образования внутримолекулярных G-квадруплексов олигонуклеотидами, содержащими четыре G-тракта из повторов теломерной ДНК человека [109, 128, 130]. В обзоре 2010 года [129] обобщены полученные на олигонуклеотидных моделях одинаковой или близкой первичной структуры термодинамические данные, в которых ΔG° варьирует в широком диапазоне (3.4–14.8 ккал/моль). Причины наблюдавшегося разброса параметров связывают с полиморфизмом теломерных ДНК-квадруплексов. В настоящее время считают, что большинство G4-мотивов могут образовывать G-квадруплексы различной архитектуры близкие по энергетике, которые находятся в динамическом равновесии. Различные формы G4 могут формироваться с разной скоростью, что приводит к образованию неидентичных наборов конформеров в разных условиях пробоподготовки и при использовании разных методов исследования [146]. Но и в одинаковых условиях одна и та же теломерная последовательность может складываться во множество различных квадруплексных структур [109], а образовавшиеся G4 могут конвертировать в другие формы, между которыми имеется незначительный энергетический барьер (2 ккал/моль) [147]. Показано, что отдельные конформеры почти идентичны по термодинамическим, электрофоретическим и гидродинамическим свойствам, но имеют различные спектры КД и ЯМР, а также кинетическую стабильность [52].

В литературе имеются противоречивые мнения о том, является ли внутримолекулярная сборка–разрушение единичного G4 простым одностадийным процессом. В некоторых публикациях утверждается, что плавление G4 подчиняется модели двух состояний [111]. Однако большинство исследователей считают, что этот процесс проходит через промежуточные состояния и не соответствует модели «все–или–ничего» [129, 148, 149]. Недавно с помощью методов КД, флуоресценции, индуцированной остатком 2-аминопурина, и FRET был доказан многоступенчатый механизм складывания теломерного G4 и изучена кинетика каждой стадии процесса [150, 151]. Согласно данным биофизических, расчетных и других методов, формирование G4 даже при внутримолекулярном сворачивании олигонуклеотида проходит через термодинамически и кинетически значимые промежуточные состояния [149, 152]. Они

могут представлять собой шпилечные структуры, взаимодействие которых приводит к образованию квадруплексного кора, или разнообразные по топологии G-триплексы, которые образуются путем отделения одного из G-трактов от квадруплекса [153]. Возможность существования таких структур, стабилизированных G-триадами, подтверждена экспериментально с помощью ЯМР-спектроскопии, КД, дифференциальной сканирующей калориметрии и др. [134, 149], а анализ свойств возможных G-триплексных форм проведен методом молекулярной динамики [154]. Показано, что кинетика сборки полноценного G4 определяется количеством промежуточных состояний. Меньшее число таких структур наблюдается в растворе K^+ , по сравнению с Na^+ -содержащим буфером [155]. Особо отмечена принципиальная разница в поведении параллельного G4 со всеми гуанозинами в *анти*-конформации, что допускает проскальзывание G-трактов друг относительно друга с образованием промежуточных форм с меньшим числом G-тетрад в квадруплексном коре, и анти-параллельного G4, в котором *син*- или *анти*-конформация остатков гуанозина, коррелирующая с направлением цепей, блокирует процесс проскальзывания. Интересно, что число и тип остатков, присоединенных к 5'- и к 3'-концам G4, влияют на скорость образования квадруплекса, но не изменяют его многоступенчатый механизм.

Кинетика сборки G-квадруплексов зависит от нуклеотидной последовательности G4-мотива и варьирует в диапазоне от миллисекунд до минут. Отмечено, что время образования G4 теломерными повторами человека, способными к очень быстрому внутримолекулярному складыванию, коррелирует со временем репликации ДНК [156]. Согласно данным, полученным с помощью различных экспериментальных подходов, в условиях низкой концентрации ионов калия (<10 мМ) наблюдается высокая скорость сборки теломерных G4 ($16\text{--}50$ s^{-1}) и относительно медленное их разрушение (1.3×10^{-3} s^{-1}) [128, 155]. Необычно медленное плавление внутримолекулярных квадруплексов постулировалось и в работе [157]. Утверждение о высокой скорости складывания G-квадруплексной структуры противоречит данным теоретического анализа [158], согласно которому конкуренция между различными формами G4, в том числе промежуточными (среди них ключевыми являются ДНК-шпильки), делает этот разнонаправленный процесс очень медленным. По мнению авторов, формирование квадруплекса – кинетически сложный механизм, в котором участвует множество альтернативных форм, и только небольшая фракция молекул складывается в конечную квадруплексную структуру. С такой кинетической картиной согласуются данные, полученные в последнее время с помощью ЯМР-спектроскопии [159] и КД [110].

Что касается межмолекулярных G4, то кинетический контроль определяет полиморфизм таких структур в еще большей степени, чем внутримолекулярных G4. В работах Прислана и др. [160] на основании традиционных подходов предложены кинетические модели, существенно различающиеся в зависимости от природы иона металла (K^+ или Na^+) в среде. Эти модели описывают процессы образования–разрушения G4 и структурные переходы между разными формами квадруплексов, образованных олигонуклеотидом $d(G_4T_4G_3)$ с двумя G-трактами.

ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДОВ МАНИПУЛИРОВАНИЯ ОТДЕЛЬНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ G-КВАДРУПЛЕКСОВ

Обычно используемые методы исследования, позволяющие изучать усредненные свойства огромного количества молекул (КД, ЯМР-спектроскопия, РСА), являются неинформативными для анализа индивидуальных типов G-квадруплексов, особенно тех, которые составляют незначительную долю в общей популяции. Для определения удельного веса различных структур в полиморфной смеси информативным является изучение поведения отдельных молекул. Так, с помощью FRET была изучена структура и динамика G4 на уровне единичных молекул, выявлено сосуществование нескольких типов квадруплексных конформаций, образуемых теломерными повторами человека [117]. В последние годы получили распространение оригинальные методы лазерных и магнитных пинцетов, которые позволяют изучать термодинамику и кинетику конформационных переходов, которые происходят за счет механического растяжения–релаксации одноцепочечных G-богатых повторов (теломерных ДНК или фрагментов промоторов), помещенных между дуплексными участками, иммобилизованными на оптически перемещаемые или парамагнитные шарики [146, 153, 157, 161, 162]. По мнению авторов [163], «расплетание» структурированных ДНК под действием растяжения физиологически более рационально, чем термическое плавление, для осуществления которого фактически нет возможностей *in vivo*. Напротив, такие процессы, как ДНК-репликация, транскрипция и другие, могут генерировать натяжение в ДНК, которое приводит к локальному «расплетанию» двойной спирали. С помощью лазерного пинцета была оценена механическая устойчивость G4, которая оказалась сравнимой с силой, вызывающей остановку ДНК- и РНК-полимераз. Проведенное с помощью этой же техники сравнительное изучение механической устойчивости G4 и шпилечных ДНК в физиологических условиях позволило сделать вывод о том,

что ДНК-квадруплексы в отличие от шпилечных структур могут служить эффективным препятствием для репликации или транскрипции [164]. Методами молекулярной динамики показано, что разрушение внутримолекулярных G4 разной топологии под действием механического растяжения сопровождается потерей координации между центральным ионом и гуанинами G-тетрад [165], что согласуется с экспериментальными данными [166].

Путем механического растяжения теломерных G4 в пионерской работе [167] удалось дискриминировать вклады петель и разных G-тетрад в стабильность квадруплекса и показать, что больший вклад вносят квадруплексные петли (рис. 2). Метод магнитного пинцета позволил охарактеризовать равновесные конформационные переходы внутримолекулярного теломерного G4 при физиологических концентрациях ионов калия (~ 100 мМ) [146], что было невозможно сделать оптическими методами из-за высокой стабильности квадруплексов в этих условиях. Во временном диапазоне в несколько минут были выявлены три квадруплексные конформации с разным временем жизни и механической устойчивостью. Показано, что кинетически контролируемое распределение изомеров G4 зависит от условий их формирования [168]; то есть, при увеличении продолжительности эксперимента в образце могут накапливаться более долгоживущие и термодинамически стабильные формы. При изучении методом магнитного пинцета кинетических свойств G4, образованного 27-звенным G-богатым участком промотора онкогена *c-Myc* при 100 мМ K⁺, показано, что доминирующая квадруплексная форма разрушается на несколько порядков медленнее, чем G-квадруплексы, имеющие другую топологию [157]. Предполагается, что такая неканоническая структура может действовать как кинетический барьер в процессе регуляции транскрипции.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что пути сборки–разрушения G4, их термодинамические и кинетические параметры могут варьироваться для разных квадруплексов и разных экспериментальных условий. По-видимому, универсального механизма, пригодного для всех G4-мотивов и условий пробоподготовки, не существует. Но сочетание современных экспериментальных технологий и продвинутых расчетных методов поможет лучше понять, какие квадруплексные конформации в наибольшей степени представлены на биологически значимой временной шкале.

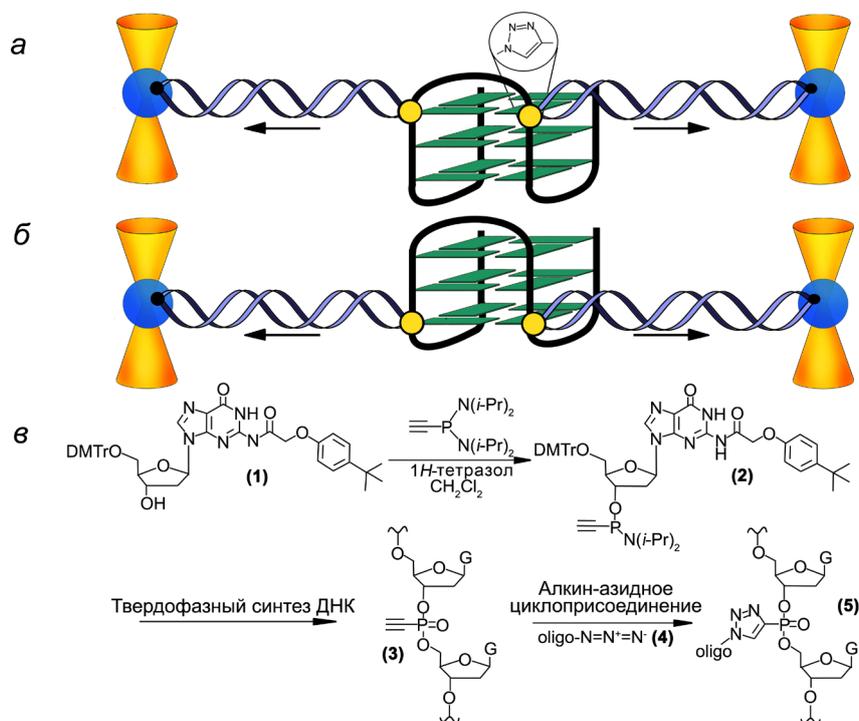


Рис. 2. Прямая оценка вклада разных G-тетрад и петель внутримолекулярного G4 в его стабильность с помощью техники лазерного пинцета и химических подходов. Каждая из трех тетрад и петлевые участки G4 были присоединены через модифицированные нуклеотидные остатки к растягивающимся дуплексным фрагментам.

На схеме представлен G4, «верхняя» или «нижняя» тетрады которого ковалентно связаны с ДНК-дуплексами (а, б). Присоединение фрагмента ДНК, несущего азидную группу (4), к гуанозиновому производному G4-мотива с алкиновой группой в прилегающем фосфатном остатке (3) осуществлялось путем алкин-азидного циклоприсоединения (5). Модифицированные остатки гуанозина (1) после введения алкиновой группы в 3'-концевой фосфат использовались в качестве синтонов (2) в твердофазном олигонуклеотидном синтезе. Это позволило вводить алкин-содержащие звенья в заданные позиции G-богатого олигонуклеотида (в). Такая же стратегия была использована для присоединения ДНК-дуплексов к петлям G4. Лазерные лучи, сфокусированные на шариках, представлены желтыми конусами.

V. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РАВНОВЕСИЕ: ДНК-ДУПЛЕКС–G-КВАДРУПЛЕКС–I-МОТИВ

За исключением одноцепочечных теломерных концов G4-образующие последовательности присутствуют в геноме вместе с комплементарной цепью в виде двойной спирали. Поэтому изучение термодинамики и кинетики равновесия между G4 и дуплексной ДНК важно для ответа на вопрос: существуют ли G-квадруплексы в геномном контексте? Для измерения эффективности образования G4 серией олигонуклеотидов, содержащих G4-мотивы в окружении одноцепочечных ДНК и в составе ДНК-дуплекса, был использован эффект разгорания флуоресценции при связывании G4-узнающих низкомолекулярных соединений с квадруplexами [116]. Как и ожидалось, в ДНК-дуплексах способность G-богатых последовательностей к образованию G4 сильно снижена из-за конкуренции с Уотсон-Криковским спариванием; интересно, что в этом случае единственной детектируемой формой являлись параллельные квадруplexы. В ряде работ было показано, что равновесие G4–ДНК-дуплекс зависит от многих факторов, которые влияют на относительную термодинамическую стабильность обеих вторичных структур: температуры, наличия фрагментов, фланкирующих G4, первичной структуры G4-мотива, катионного состава раствора и др. Один из факторов – длина петель в квадруplexе; чем они короче, тем стабильнее G4, и, соответственно, тем менее устойчив дуплекс, образованный в присутствии комплементарной цепи, из-за более короткого гибридизуемого участка [116]. Так, в физиологических условиях олигонуклеотид с теломерными повторами человека $d(\text{TTAGGG})_4$ (длины петель в потенциальном G4 равны 3:3:3) образует в присутствии комплементарной C-богатой цепи дуплексную структуру, в то время как последовательность промотора *C-тус* $d(\text{GGGTGGGGAGGGTGGG})$ преимущественно принимает конформацию G4 с петлями 1:2:1. Этот же фактор – изменение длины гибридизуемого участка, сдвигает равновесие в сторону образования дуплекса при фланкировании квадруplexного кора нуклеотидными остатками [169]. Такие же закономерности были найдены при мониторинге изотермического «расплетания» G4 в присутствии комплементарной цепи, несущей флуоресцентную метку [170]. Показано, что наличие последовательности, соседствующей с квадруplexом, ускоряет этот процесс примерно в 2 раза, а ключевым фактором, контролирующим кинетику «расплетания» G4 в присутствии комплементарной матрицы, является концентрация K^+ . Так, G4, образованный последовательностью промотора *C-тус*, остается устойчивым в присутствии комплементарной

цепи даже при 70°C в 100 мМ КСl. Если у G4-мотива имеется потенциал складываться внутримолекулярно и в несовершенный шпильчатый дуплекс, как в случае промоторного участка гена *WNT1* d(GGGCCACCGGGCAGGGGGCGGG), то K⁺-индуцированный переход в G4 происходит гораздо медленнее, чем образование квадруплекса из неструктурированного олигонуклеотида [171]. Добавление в раствор ПЭГ, понижающего активность воды, облегчает сборку G4 даже в отсутствие катионов и сдвигает равновесие от ДНК-дуплекса, образованного теломерными повторами с комплементарной цепью, к G4. Использование комплементарных проб с повышенной способностью к гибридизации, например пептидных нуклеиновых кислот (PNA), наоборот, приводит к эффективному разворачиванию G4 и образованию гетеродуплекса (DNA/PNA) [172].

In vivo цепи двуспиральных ДНК временно становятся одноцепочечными в ходе процессов репликации, репарации, транскрипции, а образующиеся раскрытые формы затем могут сложиться в различные неканонические структуры. Известно, что транскрипционная машина может генерировать отрицательную сверхспирализацию ДНК за движущейся РНК-полимеразой. Сверхспирализация стимулирует образование G4 [86], так как в условиях топологического стресса цепи ДНК-дуплекса легче «расплетаются», снимая тем самым напряжение сверхспирализации. Эффект сверхспирализации может распространяться вдоль двойной спирали хромосомной ДНК на большие расстояния, индуцируя конформационные перестройки участков генома, удаленных на нескольких тысячах пар оснований от точки начала транскрипции [86]. Поэтому более приближенными к условиям *in vivo* являются не олигонуклеотидные модели, а сверхспирализованные плазмиды, содержащие вставки двуспиральных G·C-богатых ДНК с G-трактами на одной цепи и с C-трактами на комплементарной. На этих моделях показано, что G4 могут существовать внутри дуплексной ДНК, которая является природным геномным контекстом [113, 173]. Они образуются гораздо легче при отрицательной сверхспирализации, то есть до транскрибируемой последовательности, но не после нее [86]. Статистический механизм переходов из B-ДНК в G4 включает конкуренцию между двумя состояниями, а равновесное распределение между ними при определенном уровне отрицательной сверхспирализации рассчитывается, исходя из значений свободной энергии альтернативных конформаций [174]. Современные технологии магнито-оптического пинцета, позволяющие сочетать нанометровое разрешение с возможностью генерировать с помощью пары магнитов

заданный уровень сверхспирализации ДНК, были использованы для того, чтобы количественно оценить взаимосвязь между степенью топологического стресса и эффективностью образования G-квадруплексов. Показано, что популяция G4 возрастала от 2.4 до 23% при увеличении плотности отрицательной сверхспирализации до -0.05 ; причем эффективность образования G4 коррелировала с легкостью плавления двойной спирали ДНК [175]. Кроме сверхспирализации на сдвиг равновесия от ДНК-дуплекса к G4 *in vivo* может влиять структура хроматина, связывание белков, специфически узнающих квадруплексные структуры [4], и эффект «молекулярной толкучки» [116].

С помощью олигонуклеотидных моделей и плазмидных конструкций было показано, что внутримолекулярная сборка G-богатых последовательностей может сопровождаться образованием неканонической четырехспиральной интеркаляционной формы ДНК (i-мотив) комплементарной C-богатой цепью (рис. 3) [70, 113, 176, 177]. Для этого обычно использовали методы ферментативного и/или химического футпринтинга [113], поскольку области, чувствительные к реагентам, расщепляющим одноцепочечную ДНК, являются маркерами нарушенных двуспиральной B-формы, таких как «расплетенные» участки и различные неканонические структуры. Известно, что pH-зависимый i-мотив стабилизируется полупротонированными парами $C\equiv C^+$; причем остатки цитозина в этих парах принадлежат параллельно ориентированным цепям (рис. 3а). Интеркаляция двух параллельных дуплексов во взаимно-антипараллельной ориентации приводит к формированию четырехспиральной структуры, в которой чередующиеся неканонические пары $C\equiv C^+$ лежат в разных плоскостях (рис. 3б). Факторы, которые влияют на стабильность i-мотива (значение pK_a , длина петель, эпигенетическая модификация остатков цитозина, присутствие ПЭГ, степень гидратации) недавно были проанализированы в статьях [178, 179]. В экспериментах *in vitro* было доказано, что олигонуклеотиды с G-богатой и C-богатой последовательностью из промоторов генов могут в определенных условиях складываться в G-квадруплексы и i-мотивы, соответственно. Показано, что конкуренция между двумя четырехспиральными структурами и ДНК-дуплексом зависит от типа катиона и pH среды. В статье [180] оценена степень дестабилизации ДНК-дуплекса, вызванная расположенными рядом G4 или i-мотивом. Довольно искусственная модель представляет собой фрагмент двойной спирали с выступающим одноцепочечным концом, который складывается в одну из неканонических форм. Несмотря на то, что слабодиссоцирующая среда стабилизирует i-мотив [176], образование этой альтернативной

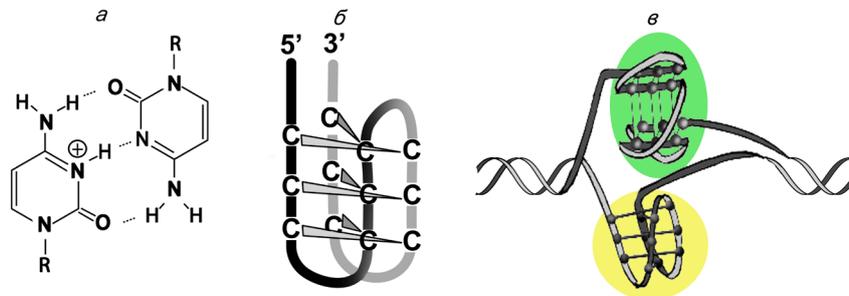


Рис. 3. Четырехспиральный *i*-мотив, образованный C-богатой цепью, комплементарной G4-образующей последовательности.

Полупротонированные пары $C \equiv C^+$ (а), стабилизирующие параллельные дуплексы, взаимная интеркаляция которых в антипараллельной ориентации приводит к формированию *i*-мотива (б). Два типа четырехспиральных структур, образуемых G/C-богатой последовательностью, интегрированной в ДНК-плазмиду; G4 затенен зеленым, а *i*-мотив – желтым цветом (в).

структуры происходит даже при нейтральных рН в условиях отрицательной сверхспирализации ДНК [113] или при добавлении реагентов, имитирующих «молекулярную толкучку» [181, 182] – двух физиологически значимых состояниях генома.

В литературе имеются противоречивые данные о том, сосуществуют ли две четырехспиральные структуры (G4 и *i*-мотив) в геноме, образуясь на комплементарных цепях одного и того же сайта, или же они взаимно исключают друг друга. С одной стороны, методами химического футпринтинга доказано формирование G-квадруплекса и *i*-мотива в промоторном участке гена *c-Myc*, вставленном в сверхспирализованную плазмиду (рис. 3в) [113]. При этом оказалось, что G4 и *i*-мотив немного смещены друг относительно друга (содержат только три общих G·C-тракта из четырех необходимых); к тому же при формировании *i*-мотива задействован более длинный фрагмент ДНК, так как, в отличие от G-квадруплекса, длинные петли повышают стабильность четырехспиральной C-богатой структуры [70]. С другой стороны, с помощью техники лазерного пинцета показано [163], что фрагмент двойной спирали, который содержит G·C-богатый район $(ACAGGGGTGTGGGC)_2 / (GCCACACCCCTGT)_2$ из промотора гена инсулина человека, складывается либо в G4, либо в *i*-мотив (в условиях, способствующих образованию обоих квадруплексов – рН 5.5, 100 mM K⁺). Образование только одного из квадруплексов в этом сайте приписывалось взаимным стерическим помехам, обусловленным

механическим растяжением–релаксацией двуспиральной молекулы при использовании этого метода. Более общий вывод был сделан в работе 2016 г., в которой с помощью лазерного пинцета и популяционного анализа исследовано образование G4 и i-мотива в различных фрагментах двуспиральной ДНК: человеческих теломерах и промоторных участках генов. Показано, что взаимоисключающее образование одного из квадруплексов является следствием их пространственной сближенности; так, в промоторе гена *Vcl-2* наблюдалось одновременное образование обоих квадруплексов, разнесенных в комплементарных цепях [183]. Вариабельность в образовании четырехспиральных неканонических структур ДНК в зависимости от нуклеотидной последовательности может более тонко регулировать генную экспрессию [184], поскольку возникновение G4 служит сигналом к ингибированию транскрипции, а i-мотив может действовать как активаторный сигнал [177, 184].

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ДНК-МОДЕЛИ, В КОТОРЫХ СОСУЩЕСТВУЮТ ДУПЛЕКСНЫЙ И G-КВАДРУПЛЕКСНЫЙ ДОМЕНЫ

В последние годы олигонуклеотидные системы, содержащие сочленения шпильчатых дуплексов и G4 различной топологии, вызывают повышенный интерес [185]. Изучение термодинамической стабильности конструкций, отличающихся ориентацией двойной спирали в одной из петель параллельного или антипараллельного G4 (коаксиальной или ортогональной) (рис. 4) показало, что в случае структурированной длинной петли стабильность квадруплекса возрастает; при этом природа нуклеотидной пары, ближайшей к сочленению дуплекса и G4, и наличие выпетливаний на границе двух доменов существенно влияет на устойчивость образующейся вторичной структуры [186]. Как показано методом ЯМР-спектроскопии, стабильные структуры образуются и в случае множественных шпильчатых дуплексов внутри одной и той же петли параллельного квадруплекса. Более того, множественные дуплексные вставки могут находиться и в разных петлях одного и того же G4, позволяя сильно расширить архитектуру подобных структур [187]. В статье 2015 года проанализировано наличие последовательностей, способных складываться в G4 с двойной спиралью в одной из петель (длиной до 20 нуклеотидных звеньев) в человеческом геноме [188]. Идентифицировано 80307 таких последовательностей, организованных в виде кластеров, которые локализованы в горячих точках мутаций и в промоторных районах генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями и с патогенезом в тканях мозга. Авторы полагают, что

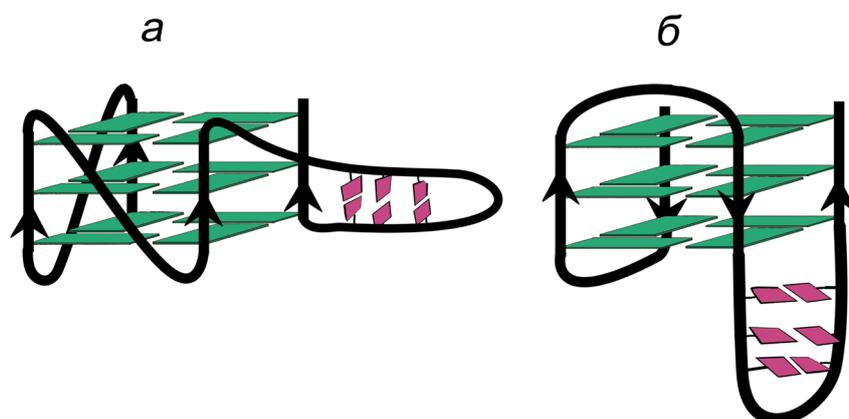


Рис. 4. ДНК-аптамеры, в которых сосуществуют квадруплексная структура и дуплекс, локализованный в одной из петель G4 (пары оснований отмечены розовым цветом).

В конструкции (а) шпильчатый дуплекс находится в ортогональной ориентации относительно параллельного G4; при этом стэкинг-взаимодействия между дуплексным и квадруплексным доменами отсутствуют. Конструкция (б) включает коаксиальную ориентацию дуплексных и квадруплексных спиралей, при которой реализуются непрерывные стэкинг-контакты вдоль обоих доменов.

подобные двухдоменные структуры могут участвовать в различных биологических процессах, включая патологические.

В других типах дуплекс-квадруплексных гибридов комплементарные последовательности присоединены к 5'- и 3'- концам G4-мотива [189, 190]. На примере тромбин-связывающего аптамера показано, что они могут образовать двойную спираль, сосуществующую с G4, только при антипараллельной топологии последнего. При этом наблюдается взаимное влияние дуплексного и квадруплексного доменов: разрушение одного из них путем направленных нуклеотидных замен приводит к диссоциации другого [190]. Пространственная структура близкого по нуклеотидной последовательности аптамера изучена методом PCA [112]. В случае, когда взаимно-комплементарные последовательности фланкируют параллельный G4, формирования дуплексного домена не происходит, так как спаривающиеся фрагменты разнесены в пространстве; их наличие только дестабилизирует G-квадруплекс [44].

VI. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МУЛЬТИКВАДРУПЛЕКСНЫХ СИСТЕМ, ОБРАЗОВАННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ НК С МНОЖЕСТВЕННЫМИ G-ТРАКТАМИ

Простые одноквадруплексные модели сейчас заменяются более биологически значимыми мультиквадруплексными, которые дают возможность изучить взаимодействие между единичными G4 [56, 191]. Главным образом исследовали конформационный потенциал длинных одноцепочечных ДНК и РНК с теломерными повторами человека [111, 192–194], а также ряд других последовательностей человеческого генома, которые содержат большое число тандемно-расположенных G-трактов – промоторы генов [195], минисателлитные локусы СЕВ25 [67], микросателлитные повторы [196].

Для структур с множественными G4 экспериментальное подтверждение получили две модели: «бусы на нитке» [67, 192–194, 197], в которой G4 отделены одноцепочечными фрагментами и ведут себя независимо друг от друга, и модель, в которой G4 соприкасаются, взаимодействуя между собой и образуя структуры более высокого порядка [111]. Причем взаимодействие соседних G4 происходит не только за счет стэкинга концевых G-тетрад, но и оснований петель, что приводит к образованию жестких сверхструктур. На основании исследований длинных теломерных ДНК и РНК методами РСА, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высказываются противоположные мнения относительно того, какой модели соответствует структурная организация последовательностей со множественными G-трактами [56, 111, 125, 191]. Эти противоречия могут быть связаны с тем, что анализ данных, полученных при изучении эффекта соседних квадруплексных единиц, осложняется структурным полиморфизмом и наличием промежуточных и дефектных структур, образующихся в процессе сборки G4 [153, 198]. В ряде работ высказывается предположение, что два типа структур («бусы на нитке» и взаимодействующие G4) могут сосуществовать в длинных теломерных ДНК или РНК, причем их соотношение зависит от различных факторов в клетке.

На более простых моделях показано, что олигонуклеотиды, содержащие более четырех трактов гуанозина, образуют набор квадруплексов путем использования различных комбинаций G-трактов (изомеры положения) [52, 199, 200]. Показано, что последовательности, способные образовывать два независимых G4, отделенные олигонуклеотидным линкером разной длины, могут складываться различным образом [199]. При коротком линкере (число нуклеотид-

ных единиц ≤ 3) образуется преимущественно один квадруплекс, причем в разных позициях вдоль цепи (выигрыш энтропии). В случае более длинного линкера образуется только одна вторичная структура с двумя G4, которые ведут себя как независимые квадруплексные единицы.

Для плавления ансамбля из нескольких G4, организованных в виде бусин на нитке, характерна модель набора состояний [111]. При этом такие структуры разрушаются при более низких температурах, чем единичные G4 [193]. К тому же, было показано, что общая стабильность гирлянды квадруплексов зависит от числа повторов. В работе 2015 года [201] было дано объяснение этому феномену. Авторы доказали, что наблюдаемое уменьшение стабильности структуры, образованной $d((GGGTTA)_{4m-1}GGG)$, где $m=2, 3, 4$, с ростом числа квадруплексных единиц связано с тем, что G4 на 5'-конце молекулы более термодинамически устойчив, чем G4 на 3'-конце, стабильность которого, в свою очередь, превышает стабильность внутренних квадруплексных доменов. То есть, устойчивость отдельного G4 в гирлянде модулируется фланкирующими его нуклеотидными участками. Так, каждый внутренний G4 окружен последовательностью TTA с двух сторон, в то время как концевые G4 – только с одной (рис. 5а). Справедливость такого объяснения подтверждается результатами исследования $T_{пл}$ длинных G4-мотивов, фланкированных тринуклеотидами TTA: $d(TTA-(GGGTTA)_{4m-1}GGG-TTA)$, где $m=2, 3, 4$. Оказалось, что общая стабильность вторичной структуры, образованной таким олигонуклеотидом, не зависит от числа квадруплексных единиц, поскольку в этом случае и внутренние, и концевые G4 соседствуют с тринуклеотидными последовательностями (рис. 5б). Интересно, что полученные результаты не меняются при варьировании длины участка, фланкирующего G4.

В то же время $T_{пл}$ квадруплексных ансамблей более высокого порядка существенно превышает $T_{пл}$ единичных G4-доменов; при этом стабилизирующим фактором являются межквадруплексные взаимодействия [196].

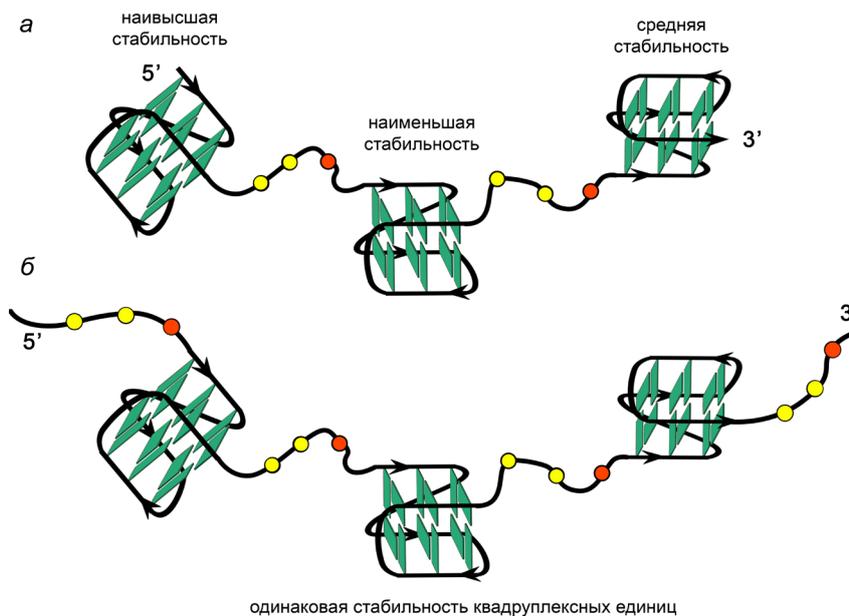


Рис. 5. Модель мультиквадруплексной системы, в которой G4 отделены тринуклеотидными линкерами.

(а) Образованная олигонуклеотидом $d((GGGTTA)_{11}GGG)$ тандемная квадруплексная структура, в которой отдельные G4 имеют разную термодинамическую стабильность из-за различной позиции фланкирующих одноцепочечных участков (с 3'-конца, с обоих 5'- и 3'-концов, с 5'-конца). (б) В противоположность этому, олигонуклеотид $d(TTA-(GGGTTA)_{11}GGG-TTA)$ образует систему, в которой каждый G4 соседствует с тринуклеотидным участком с обеих сторон, что приводит к нивелированию различий в устойчивости квадруплексных единиц. Остатки Т и А обозначены желтыми и красными кружками, соответственно.

ВИ. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЛИГАНДЫ И БЕЛКИ, УЗНАЮЩИЕ И СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ G4

Конформационные особенности G4, кардинально отличающиеся от других форм ДНК, являются основой для молекулярного узнавания таких структур низкомолекулярными лигандами. В последние две декады получены и исследованы сотни малых молекул различной химической природы, способных селективно взаимодействовать с G4 [202]. Они могут узнавать как предсформированные G-квадруплексы [203], так и индуцировать складывание таких структур соответствующими

последовательностями. Малые молекулы, которые связывают и стабилизируют G4 в теломерных ДНК и промоторах онкогенов, рассматриваются как потенциальные противоопухолевые агенты [8, 77]. Кроме того, G4-лиганды являются незаменимым инструментом при изучении биологической роли G-квадруплексов [204], а также их детекции и выделения из клеток [205–207]. Анализу взаимодействий G4-лигандов разной химической природы со своими полиморфными НК-мишенями посвящено множество статей и обзоров, однако мы ограничимся цитированием публикаций только последних лет [208–211].

Для получения соединений, которые имеют высокое сродство к G4, использован обширный химический репертуар [208]. Синтетические G4-лиганды включают производные антрахинона (BSU-1051), акридина (BRACO-19, AS1410, RHPS4), хинокридина (BOQ1, NCQ), порфирина (TMPyP4, NMM) [41], перилена (PIPER), триазина (12459) [212], бис-хинолина (360A, 307A) [213] и др. Охарактеризованы и природные макроциклические соединения, способные связываться с G4; теломестатин [214], лиганды на основе природных алкалоидов [58], таких как берберин [215], дауномицин [216], криптолепин [217], HXDV, пиридогестатин [203, 218], природные полиамины. Способность узнавать G4 проявляют и активно изучаемые узкобороздочные лиганды на основе бензимидазолов [219]. Хотя некоторые из изученных лигандов проявляют высокую избирательность и аффинность к G4, ряд свойств не позволяет считать их оптимальными. Поэтому в последние годы было получено и исследовано множество соединений, обладающих рядом со способностью связываться с квадруплексными структурами, такими преимуществами, как химическая устойчивость и легкость синтеза, повышенная растворимость в воде, способность проникать в клетку и низкая токсичность, узнавание G4 определенной топологии [220–222], хиральная селективность взаимодействия с G4 [223, 224], в частности – с Z-G4 [225], индуцирование конформационных переходов в квадруплексе-мишени [226–228], способность вызывать образование G4 (функции молекулярных шаперонов), высокая селективность взаимодействия G4 с лигандом; при этом о селективности низкомолекулярных соединений часто судят по их способности вмешиваться в биологические процессы, которые ассоциированы с образованием G4 [210, 213, 229]. Попытка оценить селективность ряда широко используемых G4-лигандов путем мониторинга плавления квадруплексов с помощью оптимизированного метода FRET предпринята в работе [34]. Особый интерес представляют соединения, меняющие свои оптические (люминесцентные) свойства при взаимодействии с G4 [207, 230–233], и реакционноспособные G4-лиганды

[234]. В последнее время активно изучают низкомолекулярные соединения, которые обладают повышенным сродством к РНК-квадруплексам [235–237], стабилизируя или разрушая [236] их. Серии новых лигандов к G4 были открыты с помощью молекулярного докинга [122, 238]. Для дизайна малых молекул с предсказанным сродством к G-квадруплексам создана база данных (<http://www.g4ldb.org>), представляющая собой уникальную коллекцию из более чем 800 известных G4-лигандов [239].

В большинстве лигандов основная G4-узнающая часть – плоская полициклическая ароматическая система, которая связывается с четверной спиралью за счет взаимодействия π -электронов ароматических колец с концевыми G-тетрадами. Недавно обнаружено, что некоторые G4-лиганды способны дискриминировать «верхние» и «нижние» тетрады одного и того же квадруплекса [240, 241]. Однако у G4 есть и другие участки связывания с малыми молекулами: бороздки, параметры которых различаются для квадруплексов разной топологии, фосфатные группы и гетероциклические основания, входящие в состав петель. Лиганды, узнающие такие структурные детерминанты, могут связываться с G4 определенной вторичной структуры [242]. Узкая специфичность подобных лигандов особенно важна для их использования в качестве новых терапевтических и диагностических средств [214]. Для придания малым молекулам желаемых свойств в них вводят положительно заряженные боковые цепи, ионы металлов, кардинально меняют пространственную структуру лиганда [243].

Большинство G4-связывающих лигандов стабилизируют квадруплексные системы. Стабилизация G4 под действием низкомолекулярных соединений определяется балансом электростатических и стэкинг-взаимодействий, водородных связей, гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых сил. Ключевыми среди них являются электростатические взаимодействия. В статье [244] рассмотрены энергетические параметры связывания G4 с лигандами, а также способы их измерения. Обсуждают два возможных механизма стабилизации G4 лигандами: (1) снижение константы диссоциации уже сформированной неканонической структуры, что приводит к продлению времени ее жизни; (2) повышение константы образования G4; при этом лиганд способствует сборке квадруплекса. Так, лиганд 360A способен ускорять формирование G4 в 10^6 раз. Известны также некоторые типы низкомолекулярных лигандов, которые приводят к дестабилизации и даже разрушению квадруплексных структур [245]. Некоторые G4-лиганды способствуют нарушению функций теломер, препятствуя связыванию с теломерными ДНК белков

защитного комплекса [66]. Лиганды, стабилизирующие G4, могут ингибировать их разворачивание хеликазами, конкурируя с белками за связывание с такими неканоническими формами [213]. Известны также низкомолекулярные соединения, которые вносят повреждения в ДНК, например, пиридостатин, вызывающий двухцепочечные разрывы [203]. Такие лиганды рассматриваются как эффективные противоопухолевые агенты, поскольку они влияют на выживаемость клеток, особенно если в них ингибирована или мутирована система репарации ДНК [246].

Структурная информация о комплексах G-квадруплексов с лигандами получена с помощью ЯМР-спектроскопии [126] и РСА [247]. В обзоре, посвященном структурному анализу таких комплексов [16], констатируется, что при связывании лиганда его плоская ароматическая часть не интеркалирует в квадруплексный кор, а взаимодействует с концевыми G-тетрадами. При этом положительно заряженные группы, такие как протонированный азот акридинового кольца, могут использовать центральную электроотрицательную полость квадруплекса для усиления взаимодействия лиганда с G4. Отмечена возможность структурной адаптации квадруплекса к лиганду, в частности, реорганизации петель для увеличения площади поверхности G-тетрад (до гексад и октад) за счет включения дополнительных оснований или пар оснований петель в плоскость концевых тетрад. Данные РСА показывают, что природа петель G4, определяющая доступность бороздок этой неканонической формы ДНК, существенно влияет на селективность лиганда [247].

Следует отметить, что все внутримолекулярные G4, сокристаллизованные с низкомолекулярными соединениями, показывают параллельную топологию [16, 215]. По-видимому, это связано с обезвоживанием образца при кристаллизации (известно, что дегидратация индуцирует образование параллельных G4) и ограничениями, налагаемыми кристаллической решеткой. Взаимодействие лигандов с G4 разных конформаций охарактеризовано также методами молекулярной динамики [248]. К настоящему времени в базе данных Protein Data Bank (PDB) сообщено о структуре примерно 25 комплексов G4 с лигандами [248].

Несмотря на стремление лучше понять механизмы молекулярного узнавания G4 ароматическими лигандами, имеется немного сообщений об исследовании термодинамики образования таких комплексов. В работе 2015 г. [226] сравнили термодинамические и структурные характеристики связывания шести различных по химической природе соединений с теломерными ДНК человека. Анализ эксперимен-

тальных данных, полученных с помощью изотермической калориметрии, КД, флуоресцентной спектроскопии, гель-электрофореза и молекулярного моделирования, позволил оценить доминирующие силы (специфические взаимодействия, изменения в сольватации и конформационном состоянии квадруплекса), которые управляют связыванием лигандов с G4. При этом впервые принято во внимание наличие промежуточных структур при сборке G4. Оказалось, что полученные параметры значительно различаются для слабоселективных и квадруплекс-специфичных (высокоселективных) лигандов.

Изучение связывания ароматических лигандов с мультимерными G4 показало, что лиганд как правило встраивается между двумя G4, образуя сэндвич-подобную структуру за счет стэкинг-взаимодействия с концевыми G-тетрадами соседних квадруплексов [249, 250]. Причем на эффективность образования таких комплексов влияет расстояние между единичными квадруплексами в мультимерной системе [251]. Недавно, однако, было показано, что один из энантиомеров хирального никель-содержащего лиганда не встраивается между двумя квадруплексными единицами, а покрывает их «сверху», соответствуя по размерам двум G-тетрадам. При этом он в 200 раз эффективнее связывается с G-квадруплексным димером, чем с изолированным G4 [252].

Среди огромного количества органических молекул, способных специфически связываться с квадруплексами ДНК, особое место занимают металлокомплексы, которые начали систематически исследовать в последнее десятилетие. G4-лиганды на основе металлокомплексов сочетают преимущества органического соединения и координирующего действия металла. Они относительно просты в получении и обладают необычными оптическими, магнитными и каталитическими свойствами, что делает их привлекательной основой для создания библиотек G4-селективных лигандов, G-квадруплексных оптических проб и расщепляющих агентов. В обзорах [253, 254] приведена исчерпывающая классификация металлокомплексов, специфически связывающихся с G4 (макроциклические лиганды, немакроциклические полидентатные лиганды, объемные металлокомплексы с плоскими поверхностями, хиральные цилиндрические комплексы, люминесцентные металлокомплексы и др.), описаны их структурные особенности, дополнительные геометрические и электронные возможности для специфического связывания с G4 и механизмы взаимодействия с квадруплексами ДНК. Некоторые типы металлокомплексов были сконструированы таким образом, чтобы вносить повреждения и разрывы в ДНК. Так, с помощью

реакционноспособного лиганда Zn-ТТАР на основе фталоцианина разработан метод определения ориентации цепей в G4 [255]. В его основе лежит фоторасщепление цепи ДНК между гуанозинами вдоль оси квадруплекса, преимущественно после гуанозина, принадлежащего «верхней» G-тетраде, с которой взаимодействует металлокомплекс.

Алкилирующие G4-лиганды рассматриваются в настоящее время как один из классов химиотерапевтических препаратов [234]. Индуцированная ими адресованная модификация ДНК может препятствовать правильному считыванию генетической информации, приводя к гибели опухолевых клеток. Кроме медицинского приложения ковалентная модификация G4 с помощью реакционноспособных лигандов предлагается как эффективная стратегия для обнаружения и мониторинга образования G4 по всему геному и транскриптому. Маркирование G4-сайтов может осуществляться путем аффинного выделения соответствующих фрагментов ДНК, с которыми ковалентно связаны высокоселективные лиганды [256]. Для реакционноспособных молекул важно минимизировать неспецифическую нуклеофильную атаку и сделать процесс алкилирования обратимым для того, чтобы выделенный из генома фрагмент ДНК не нес на себе ковалентно-связанное низкомолекулярное соединение. В качестве алкилирующего реагента, присоединенного к G4-лиганду, предложили использовать электрофильный интермедиат, хинонметид, способный к обратимому алкилированию и образующий устойчивые в водных растворах аддукты с ДНК [257]. Преимуществом хинонметида является то, что он может быть легко получен из подходящих водорастворимых предшественников путем мягкой активации – фотохимической, восстановительной, окислительной, термической и др. [258]. Недавно развитые химические стратегии для выделения и внутриклеточной локализации G-квадруплексов на основе модифицированных G4-лигандов были суммированы в обзоре [256]. С помощью разработанных подходов можно ввести в лиганд остаток биотина для аффинного выделения ДНК-квадруплекса на магнитные частицы, покрытые стрептавидином [205], перенести флуорофор от лиганда к G4 с помощью химических реакций, стимулированных эффектами близкого действия, или ввести предшественник хинонметида в малую молекулу для ее дальнейшей химической модификации. Поскольку наличие объемных заместителей может влиять на клеточный захват лиганда, аффинность и селективность их взаимодействия с G4, более перспективной является стратегия, основанная на введении в состав G4-лиганда необъемных остатков алкинов. Эти группы

могут быть перенесены с лиганда на G4, например, путем реакции между нуклеофильной группой нуклеотида в петле квадруплекса и электрофильным центром на линкере, соединяющем алкин с лигандом [256]. Малые молекулы, содержащие алкиновые функции, могут быть иммобилизованы методом циклоприсоединения на несущие азидо-группы шарики, либо присоединены к флуоресцентным меткам непосредственно в клетке. Флуорогенные G4-лиганды были использованы для оптической визуализации G-квадруплексных аптамеров, внесенных в клетки рака легких [259]. С помощью конфокальной микроскопии была прослежена эффективность захвата G-богатых олигонуклеотидов и выяснена внутриклеточная локализация образуемых ими квадруплексов. Показано, что параллельные G4 детектируются главным образом в лизосомах клеток, а антипараллельные структуры найдены в митохондриях. Эти находки важны в плане доставки лекарственных средств в специализированные клеточные органеллы с помощью G-квадруплексных аптамеров.

Недавно разработана революционная стратегия синтеза «умных» G4-лигандов, основанная на матрично-зависимой сборке водорастворимых соединений, имитирующих G-тетраду (Template-Assembled Synthetic G-Quartet, TASQ); причем этот процесс происходит только в присутствии G-квадруплексной мишени. Так, в работе [260] сконструирована и получена оригинальная молекула, чья структура может перестраиваться при взаимодействии с G4, но не с дуплексной ДНК. «Умный» лиганд за счет матрично-зависимой внутримолекулярной реакции формирует искусственную G-тетраду, которая связывается с концевой тетрадой квадруплекса, стабилизируя его (рис. 6). Координация металла (тербия) во внутренней полости молекулы способствует организации активного закрытого состояния, а прецизионно расположенные положительные заряды на боковых заместителях еще более усиливают сродство лиганда к G4. Продемонстрировано применение таких соединений как искусственных рецепторов для тестирования взаимодействия концевых G-тетрад квадруплекса с низкомолекулярными лигандами [261]. Квадруплексные лиганды-биомиметики нового поколения способны служить также «умными» флуоресцентными пробами [262]. В неактивном состоянии флуоресценция лиганда погашена за счет внутримолекулярного фотоиндуцированного переноса электронов, а в закрытой конформации, инициированной самосборкой искусственной G-тетрады, флуоресценция восстанавливается. Первый такой лиганд, РугоTASQ, на основе пирена показал себя эффективной G4-специфичной пробой для исследований *in vitro* [262]. Однако он

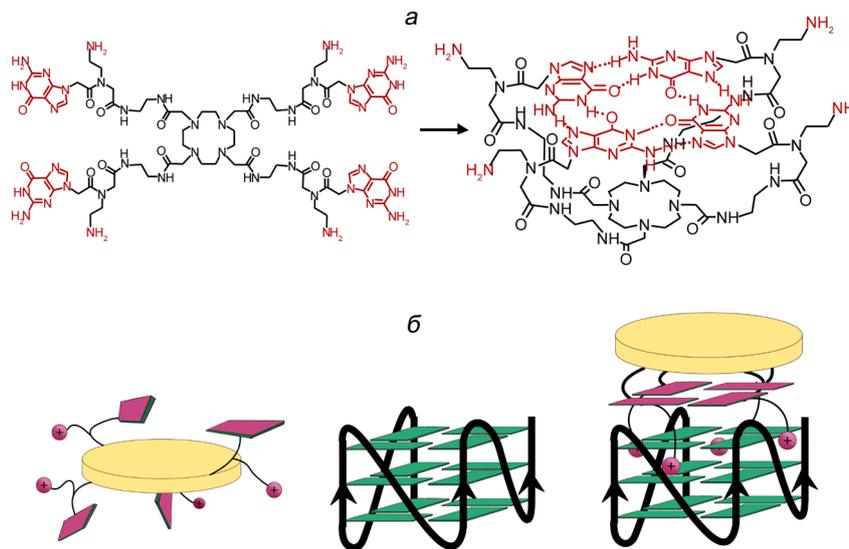


Рис. 6. «Умные» G4-лиганды, способные формировать искусственную G-тетраду за счет матрично-зависимой внутримолекулярной реакции; при этом матрицей является концевая тетрада G4.

a – Химическая структура «умного» лиганда, который перестраивается в активное (закрытое) состояние, генерируя искусственную G-тетраду.

б – Схема, иллюстрирующая принцип действия «умных» лигандов, где желтым диском представлен G4-связывающий домен молекулы, а розовыми прямоугольниками – остатки гуанина, формирующие новую G-тетраду.

имел склонность агрегировать во внутриклеточной среде. Специально созданный N-TASQ, в котором пирен был заменен на остаток нафталина, оказался пригодным для внутриклеточных исследований. В частности, с его помощью проведена прямая детекция РНК G4 в необработанных предварительно (фиксация, пермеаблизация и др.) клетках человека и мыши [263].

КЛЕТОЧНЫЕ И ВИРУСНЫЕ БЕЛКИ

Наличие функционально-важных белков, которые специфически связываются с G4, является одним из важнейших факторов, поддерживающих гипотезу о биологической значимости таких структур. Регуляторные функции G4 в клетке могут осуществляться только при участии белковых факторов, которые модулируют их термодинамическую стабильность и конформацию. К настоящему времени идентифицировано множество белков, специфически связывающихся

с ДНК-квадруплексами [264–266] и с РНК-аналогами G4 [267, 268]. Для выделения таких белков используют аффинную хроматографию (например, с использованием биотинилированных G4-образующих олигонуклеотидов, которые связываются с шариками, покрытыми стрептавидином) с последующим масс-спектрометрическим (LC-MS/MS) анализом [269, 270]. В недавней статье [271] описано выделение путем разработанной системы скрининга ряда клеточных белков (ядерных рибонуклеопротеидов, рибосомных белков, факторов сплайсинга), которые специфически связываются с G4-мотивом в 5'-нетранслируемых участках мРНК. Отобранные соединения были охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии MALDY TOF, а их константы диссоциации с РНК G4 (наномолярный диапазон) определены методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса.

Белки, узнающие G4, принадлежат к разным классам и выполняют различные функции в клетке: участвуют в регуляции длины теломер, в сборке рибосом [272], в процессах транскрипции, трансляции, сплайсинга или альтернативного сплайсинга [20, 269, 273–276], в репликации и репарации ДНК [277, 278], в репликации ДНК пониженной точности через поврежденные нуклеотидные звенья [279], в обратной транскрипции [206], спаривании гомологичных хромосом во время мейоза, в разрушении вторичной структуры ДНК, в изменении топологического состояния ДНК и других процессах метаболизма нуклеиновых кислот. G4-связывающие белки подразделяют на три функциональные группы: (1) белки, ассоциированные с теломерами, например, белки защитного комплекса [267, 280, 281]; (2) белки, способные «расплетать» G4 и даже расщеплять их, такие как ДНК- и РНК-хеликазы (молекулярные моторы, которые, «расплетая» структурированные нуклеиновые кислоты, включены во многие биологические процессы), нуклеазы [273, 282, 283]; (3) белки, которые стабилизируют G-квадруплексы и иницируют (ускоряют) их сборку, действуя как молекулярные шапероны, например, нуклеолин (многофункциональный ядерный белок) и нуклеофосмин [269, 276, 284]. Белки и ферменты, обладающие повышенным сродством к G-квадруплексам по сравнению с двуспиральными или одноцепочечными ДНК, могут не только дискриминировать такие неканонические структуры, но и распознавать их топологию [269].

Несмотря на активное изучение комплексов белков с G4, структурные основы узнавания квадруплексов белковыми молекулами остаются неясными, а сами исследования в этой области – отрывочными и несистематизированными. Экспериментальными методами

высокого разрешения установлено, что на белково-нуклеиновое связывание влияют петли G4 [112] и сочленение дуплексных и квадруплексных доменов в НК-мишени [189, 285]. С помощью молекулярного моделирования показано, что по размерам G4 точно соответствует полости интегразы ВИЧ-1 и белка RecA [55], а домен белка нуклеофосмина ложится в бороздку квадруплекса [286]. Недавно методом ЯМР-спектроскопии было показано, что две молекулы пептида, последовательность которого соответствует фрагменту прионного белка, связываются с концевыми G-тетрадами РНК G4 за счет гидрофобных взаимодействий (благоприятное изменение энтропии воды) [287]. В 2015 г. с помощью этого же метода была идентифицирована 18-звенная G4-связывающая аминокислотная последовательность РНК-хеликазы RHAU, которая покрывает концевую G-тетраду параллельного ДНК G4 и охватывает квадруплексный кор за счет электростатических взаимодействий между тремя положительно заряженными аминокислотами и отрицательно заряженными фосфатными группами [288]. Примечательно, что эта модель связывания сильно напоминает таковую для большинства G4-специфичных низкомолекулярных лигандов. Изучение кристаллической структуры комплекса аргинин- и глицин-богатого пептидного фрагмента белка FMRP с РНК, содержащей G-квадруплексный и дуплексный домены, с разрешением 2.8 ангстрема позволило выяснить молекулярные принципы, объясняющие специфичность белково-нуклеиновых взаимодействий, и идентифицировать широкую сеть контактов между пептидом и РНК, которые включают не только G-тетраду и границу между G4 и дуплексным доменом, но и распространяются на дуплексный район РНК [289]. Следует отметить, что FMRP – хорошо охарактеризованный регуляторный РНК-связывающий белок, играет центральную роль в развитии целого ряда неврологических расстройств человека, включая аутизм. Полагают, что взаимодействие этого белка с РНК-квадруплексами непосредственно влияет на регуляцию трансляции сотен ключевых мРНК в клетках нейронов, а нарушение таких взаимодействий рассматривается как один из основных механизмов запуска патологических изменений, приводящих к ментальным нарушениям [20]. В работе [290] изучена роль ароматических аминокислот – тирозина и фенилаланина, в С-концевом домене белков, ассоциированных с липосаркомой и с саркомой Юинга, в узнавании теломерных ДНК- и РНК-квадруплексов. Показано, что остатки фенилаланина исключительно важны для специфического связывания с G4. Так, замена трех Phe на остатки аланина предотвращает взаимо-

действие соответствующего пептида с квадруплексной структурой. А дискриминации теломерных ДНК G4 и РНК G4 можно добиться, заменяя остатки Phe на Tyr. Такой замещенный пептид узнает и связывает преимущественно РНК-квадруплекс из-за большей гидрофильности остатков тирозина по сравнению с фенилаланином. С помощью серии модельных структур, содержащих модификации в петлях ДНК- и РНК-квадруплексов (апурин/апириимидиновые сайты, 2'-О-метильные производные или нуклеозиды с замкнутым рибозным кольцом (LNA, Locked Nucleic Acids), показано, что остатки Tyr узнают главным образом 2'-гидроксильные группы рибозы.

Согласно современной парадигме, G4 и узнающие их белки являются ключевыми игроками в ряде важнейших процессов жизнедеятельности. В частности, G4 рассматриваются как эндогенный источник хромосомной нестабильности [291], ассоциированной со многими заболеваниями человека [292, 293]. Данные, накопленные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что если четырехспиральные неканонические формы ДНК не разрушаются белками, то они могут препятствовать процессам транскрипции, репликации [294, 295], репарации или гомологичной рекомбинации ДНК. Это приводит к двухцепочечным разрывам, геномным перестройкам, экспансии G-богатых повторов [296–298]. Причем геномные повреждения тем существенней, чем выше термодинамическая стабильность квадруплекса [139]. В то же время отмечается, что устойчивые G4 являются не единственной причиной ингибирования репликации и могут существовать альтернативные механизмы, объясняющие этот феномен. Так, ДНК-полимераза δ останавливается вблизи теломерных G4-мотивов независимо от того, образуются ли квадруплексные структуры на запаздывающей цепи [299]; исследования на клеточном уровне показали, что эти последовательности вообще трудны для репликации. В отличие от высокоточных репликативных ДНК-полимераз специализированные ДНК-полимеразы эукариотических клеток, которые могут встраивать нуклеозиды напротив некоторых типов точечных повреждений, способны предотвращать геномную нестабильность при G4. Имеются косвенные доказательства того, что некоторые из них, например, Pol κ , Pol η и Rev1 (члены Y-семейства), могут обеспечивать эффективную прогрессию репликации через ДНК-квадруплексы [300]. Структурные особенности наиболее изученной Rev1 объясняют, почему эта полимеразы оперирует преимущественно на G-богатых матрицах.

Особое место среди белков, специфически связывающих и разворачивающих G-квадруплексные структуры, занимают хеликазы,

которые предотвращают геномную нестабильность, вызываемую G4-образующими последовательностями [282, 298]. Механизм и кинетика разрешения G4 хеликазами семейства Pif1, представленными в эволюционно далеких организмах (от бактерии до человека), которые при этом активируются и более охотно «расплетают» двуспиральные ДНК в процессе репликации, обсуждается в работах [301–303]. В отличие от высокопроцессивной активности, показываемой хеликазами Pif1, которые остаются связанными со своим ДНК-субстратом, G4-резольваза 1 (известная также как DNX36 или RHAU), способная прочно связывать и разрешать ДНК G4 и РНК G4, является непроецессивной, так как отделяется от субстрата после каждого акта гидролиза АТФ [304]. А разворачивание внутримолекулярных G4 АТФ-зависимой ДНК-хеликазой BLM из семейства RecQ, как показано методом FRET на единичных молекулах, осуществляется посредством различных механизмов в зависимости от структурного окружения квадруплекса – одно- или двухцепочечного [305]. Техника, развитая на основе флуоресцентных методов, позволила тестировать «расплетание» различных квадруплексов ДНК-хеликазами в режиме реального времени [34]; при этом образование комплекса G4 с низкомолекулярным квадруплекс-стабилизирующим лигандом ингибировало активность фермента, причем степень ингибирования зависела от строения G4 и типа лиганда. Разная эффективность денатурации G4 различного строения белком репликации A (RPA) была выявлена и в работе [306] с помощью FRET на единичных молекулах. Факторы стабилизации квадруплекса, такие как наличие коротких петель (менее трех нуклеотидных единиц) и более чем трех G-тетрадных слоев, способствовали сохранению квадруплексной конформации даже при физиологической концентрации белка, что повышает функциональную значимость таких структур [307].

Изучение влияния G-квадруплексов на функционирование G4-связывающих белков было предпринято в ряде работ последнего времени. Так, с помощью манипулирования единичными молекулами показано, что теломерные ДНК G4, которые модулируют *in vitro* теломеразную активность, могут влиять и на связывание других белков, включенных в биологию теломер [118, 308]. И наоборот, белки, связывающиеся с теломерными концами, контролируют образование ДНК G4 в клетке. Имеются данные о влиянии G4 на транслокацию каталитической субъединицы теломеразы (TERT) из ядер в митохондрии, которые играют важную роль в клеточном апоптозе, индуцированном квадруплекс-связывающими лигандами [309]. Установлено, что G4 разной топологии могут ингибировать

опосредованное топоизомеразой I расщепление одной из цепей двойной спирали [44, 310, 311], влияя тем самым на степень сверхспирализации ДНК. Специализированные ДНК-полимеразы низкой точности hPol η и hPol ϵ семейств Y и B, соответственно, способны осуществлять репликацию через поврежденные нуклеотидные звенья, сохраняют разную степень активности на G4-содержащих субстратах в зависимости от степени специфического связывания с G-квадруplexами [279]. Показано, что G4 в 20% генов человека являются мишенями двух компонентов (XPD и XPB) транскрипционного фактора TFIIH [283]; при этом XPD действует как ДНК G4-хеликаза, а XPB – как G4-связывающий белок. Поскольку оба компонента играют решающую роль в координировании системы проверки повреждений ДНК и механизмов репарации, связанных с разведением цепей двойной спирали, предполагается, что G4 могут регулировать эти процессы. В работе [312] обсуждается механизм, основанный на взаимодействии ДНК G4 с дрожжевым коактиватором транскрипции Sub1 и его человеческим гомологом PC4, посредством которого G-квадруplexные структуры могут влиять на регуляцию генной экспрессии и другие процессы метаболизма ДНК.

В последние годы возросли наши знания о биологической значимости G4 в прокариотах [10, 98] и вирусах [313]. Показано, что G-квадруplexы специфически узнаются различными вирусными белками, такими как ядерный антиген 1 вируса Эпштейна-Барра [103], уникальный домен (SUD) коронавируса SARS, который существует исключительно в высокопатогенных штаммах [314], и нуклеолин – многофункциональный фактор хозяйской клетки, который связывается с высокой аффинностью с квадруplexами, образуя в длинных концевых повторах промотора ВИЧ-1, ингибируя вирусную транскрипцию [276]. Кроме того, установлено, что G-богатая последовательность ДНК в районе U3 вируса ВИЧ-1, способная складываться в G4, содержит три сайта связывания транскрипционного фактора Sp1, который включен в регуляцию экспрессии вирусных генов [100]. G-квадруplexные аптамеры, которые были нацелены на белки ВИЧ-1 и рассматривались как потенциальные ингибиторы репликации генов этого вируса в клетках и вирусной интеграции *in vitro* [315], показали антивирусную активность [316].

АНТИТЕЛА К G4

Как любая неканоническая форма ДНК, G-квадруplexы являются иммуногенными. В литературе описаны антитела, обладающие в 1000 раз большей аффинностью к четырехспиральным ДНК по

сравнению с дуплексными структурами; при этом некоторые из них являются высоко специфичными для параллельных G4, в то время как другие связываются и с параллельными, и с антипараллельными G-квадруплексными структурами. Более того, выделены и охарактеризованы антитела, способные со 100-кратной специфичностью дискриминировать параллельные G4, которые отличаются друг от друга только структурой петель [317]. Обычно антитела получают из огромной библиотеки бактериофагов, каждый из которых экспонирует уникальное антитело на своей поверхности (фаговый дисплей). Бактериофаги, несущие G4-узнающие антитела, выделяют путем связывания с иммобилизованными ДНК-квадруплексами [317]. Антитела разной специфичности были успешно использованы как инструменты количественной детекции ДНК- и РНК-квадруплексов в клетках с помощью различных вариантов иммунофлуоресцентного анализа [318–320].

Антитела к G-квадруплексам были использованы также для доказательства того, что четырехспиральные ДНК модулируют генную экспрессию *in vivo*. Наличие таких антител в человеческих клетках карциномы желудка приводило к значительному изменению экспрессии большой группы генов (из изученного набора, включающего более 18000 генов), регуляторные участки которых обогащены G4-мотивами [321].

VIII. ПОЛИМОРФИЗМ ТЕЛОМЕРНЫХ G-КВАДРУПЛЕКСОВ

Ярким примером гетерогенности G-квадруплексных структур при исследованиях *in vitro* являются внутримолекулярные G4, образованные одноцепочечными теломерными последовательностями [148, 322]. Наиболее изучены G4, образованные теломерными повторами человека [57, 323], повышенный интерес к которым вызван тем, что они могут действовать, как супрессоры опухолевого роста [66, 324].

Теломеры – специализированные белково-нуклеиновые структуры на концах эукариотических хромосом, которые защищают эти концы от нежелательной рекомбинации и деградации. Известно, что теломерная ДНК в нормальных соматических клетках прогрессивно укорачивается с каждым раундом клеточного деления из-за неспособности ДНК-полимеразы полностью реплицировать 3'-концы и из-за нуклеолитического процессинга. После достижения критической длины (предел Хейфлика) репликация в клетках останавливается и клетка уходит в фазу сенесенса, которая предшествует апоптозу. В противоположность этому, в опухолевых клетках запускается механизм под-

держания длины теломер при неограниченном клеточном делении путем активации теломеразы, фермента рибонуклеопротеидной природы, способного синтезировать G-богатые повторы при 3'-конце теломерной ДНК по механизму обратной транскрипции, или путем альтернативного удлинения теломер, основанного на рекомбинации (ALT). Увеличение теломеразной активности наблюдается более чем в 85% опухолевых клеток, а механизм ALT задействован в 15% опухолей. Поскольку в подавляющем большинстве клеток организма теломеразная активность либо полностью отсутствует, либо существенно снижена (как в стволовых и половых клетках), то ингибирование этого фермента будет способствовать замедлению опухолевого роста, не оказывая токсического действия на организм [325].

Сворачивание одноцепочечного фрагмента на концах хромосом в квадруплексную структуру может эффективно блокировать нежелательную элонгацию теломерной ДНК путем предотвращения ее гибридизации с теломеразной РНК, которая служит матрицей для синтеза теломерных последовательностей [326]. Образование квадруплексов препятствует также реализации альтернативного пути удлинения теломер за счет ингибирования ранних стадий рекомбинации [18, 326]. Показано, что белки рекомбинации связываются с ДНК только после «расплетания» теломерного квадруплекса хеликазами. Поэтому стабилизация квадруплексных структур в человеческих теломерных ДНК низкомолекулярными лигандами представляет собой перспективную противоопухолевую стратегию [66]. Использование G4-стабилизирующих лигандов может приводить к дисфункции теломер и вне зависимости от процесса их удлинения теломеразой. Так, теломестатин может вызывать удаление защитного теломерного белка TRF2, что приводит к повреждению теломерной ДНК в стволовых клетках глиомы и, в результате, к замедлению роста глиобластомы – злокачественной опухоли мозга. При этом неглиомные клетки оказались не чувствительны к обработке G4-стабилизирующим лигандом [327]. Кроме того, полагают, что G-квадруплексы могут быть вовлечены в кэпирование и защиту теломер от деградации или слияния концов. Постулированная много десятилетий назад функция G-квадруплексов как защитного механизма хромосомных концов была строго доказана для дрожжевых теломер, во всяком случае тогда, когда другие формы кэпирования были дефектными [326].

Теломерные G4 образуются за счет внутримолекулярного складывания тандемно расположенных G4-мотивов, хотя в ранних работах отмечалось, что в некоторых инфузориях теломерные 3'-концы обра-

зуют межмолекулярные G-квадруплексы, которые связывают вместе хромосомы макроядер.

Использование G-квадруплексов теломерных ДНК как мишеней для противоопухолевых агентов требует детализации структуры образующихся G4, в частности, в условиях, наиболее близко имитирующих внутриклеточные. Дело осложняется тем, что структура и стабильность наиболее изученных квадруплексов, образованных четырьмя теломерными ДНК-повторами человека, d(TTAGGG), сильно зависят от наличия фланкирующих нуклеотидных остатков, концентрации ДНК [119], условий внешней среды, таких как ионный состав раствора и наличие G4-специфичных лигандов [228], от степени гидратации ДНК, контролируемой добавлением ПЭГ [328], пробоподготовки и методов исследования [119]. Кроме того, следует учитывать, что кроме конечного состояния теломерные повторы образуют промежуточные шпильчатые и G-триплексные структуры [299].

Показано, что топология G-квадруплекса, образованного олигонуклеотидом d(AGGG(TTAGGG)₃) и олигомерами с близкой нуклеотидной последовательностью, резко различается в кристаллическом состоянии и в растворе. Согласно данным PCA, d(AGGG(TTAGGG)₃) в присутствии ионов K⁺ складывается в параллельный внутримолекулярный G-квадруплекс с петлями пропеллерного типа (PDB ID: 1KF1). А в растворе, содержащем те же ионы (K⁺), идентифицированы антипараллельный G4 [47] и различные варианты смешанных (параллельных–антипараллельных) форм G-квадруплексов, которые различаются строением петель; причем на соотношение между ними влияют присоединенные к олигонуклеотиду 3'-концевые нуклеотидные звенья. Однако в условиях пониженной активности воды (дегидратации), вызванной добавлением этанола, ДМСО, ацетонитрила или высокомолекулярного ПЭГ разной длины, был зарегистрирован параллельный внутримолекулярный G-квадруплекс наподобие того, который наблюдался в кристаллическом состоянии [191, 329]. Поскольку ПЭГ обычно добавляли в раствор олигонуклеотида для того, чтобы приблизить условия к внутриклеточной «молекулярной толкучке», до недавнего времени в качестве физиологически значимой конформации квадруплекса, образованного теломерными повторами человека, рассматривалась внутримолекулярная параллельная структура [191, 329]. Однако, как было показано в последние годы, присутствие ПЭГ не столько имитирует высокую концентрацию биополимеров, сколько способствует обезвоживанию образца, меняя, как и другие сораст-

ворители, структуру воды [18, 330]. Иницируемый ПЭГ переход квадруплекса из более компактной смешанной формы в гидродинамически менее компактную параллельную нельзя объяснить эффектом исключенного объема, скорее, большей аффинностью ПЭГ к параллельной конформации G4, как было показано в статье [331]. К тому же, использование вместо ПЭГ других соединений, более подходящих для имитации природного биологического окружения и создания эффекта высокой концентрации биополимеров – 40% полисахарида (фикол 70), 30% сывороточного альбумина или БСА (300 мг/мл), не способствовало стабилизации параллельной формы G4 [194, 332, 333]. То, что именно дегидратация, а не эффект исключенного объема является силой, которая индуцирует образование параллельного квадруплекса, показано в работе 2013 года [164]. В ней структурные и механические свойства человеческого теломерного квадруплекса изучены на уровне отдельной молекулы методом лазерного пинцета.

К конверсии антипараллельного G4 в параллельный может приводить как увеличение количества соразтворителя, так и высокая концентрация ДНК (6–9 мМ) [334]. В таких концентрированных растворах сам олигонуклеотид начинает играть роль агента, имитирующего «молекулярную толкучку». Несмотря на различия в механизме действия, оба эти фактора приводят к эффекту дегидратации, то есть, к снижению активности воды [335]. Концентрационная зависимость топологии G4 может служить объяснением того, почему различные экспериментальные методы, которые требуют образцов ДНК с концентрацией, различающейся на порядки, выявляют различные типы квадруплексной укладки одного и того же олигонуклеотида. Интересно, что G4, стабилизированный ионами натрия, сохраняет антипараллельную топологию независимо от концентрации ДНК [119].

Обычно считается, что в растворе, содержащем ионы Na^+ , структурный полиморфизм теломерных повторов гораздо менее выражен, чем в K^+ -содержащей среде. Так, олигонуклеотид $d(\text{AGGG}(\text{T TAGGG})_3)$ в растворе Na^+ образует исключительно антипараллельный трехтетрадный G4 с конформацией типа «корзина». Однако недавно для более длинных олигомеров, содержащих нуклеотидные звенья, фланкирующие G4-кор, методом ЯМР-спектроскопии показано образование антипараллельной внутримолекулярной структуры, которая отличается от стандартного квадруплекса характером водородных связей в G-тетрадах и расположением петель [127]. В работе [336] различные конформации G-квадруплексов, образуемых теломерными последовательностями, и их динамика изучены в Na^+ -содержащих растворах методом FRET на единичных молекулах.

Этот метод позволяет охарактеризовать структурный полиморфизм НК и кинетику конформационных переходов во временной шкале от миллисекунд до минут. Наряду с развернутым состоянием были идентифицированы по крайней мере три различных теломерных квадруплекса, между которыми имелось динамическое равновесие. Эти данные изменяют мнение об ограниченных конформационных возможностях теломерных G4 в Na⁺-содержащих растворах и свидетельствуют о полиморфной природе теломерных повторов и в этих условиях (обзоры по структуре теломер см. в [57, 281]). В статье 2016 г., в которой изучался конформационный потенциал теломерных ДНК в условиях низкой концентрации катионов, показано, что при добавлении незначительного количества KCl в Na⁺-содержащий раствор наблюдается конверсия антипараллельного G4 в параллельный [22].

Так как уровень K⁺ в клетках млекопитающих (примерно 100–150 мМ) значительно выше содержания ионов натрия, более физиологически значимой представляется структура, полученная в присутствии ионов калия. В 2013 г. была изучена конформация d(AGGG(TTAGGG))₃ в живых ооцитах *X. laevis* и *ex vivo*, в клеточном экстракте этих ооцитов, в которых реализуются природные условия «молекулярной толкучки» [194]. Следует отметить, что для исследований *in vivo* был применен недавно разработанный метод ЯМР-спектроскопии в клетке (in cell-NMR), который позволяет оценить структуру нуклеиновых кислот во внутриклеточной среде эукариот. С помощью этого подхода и флуоресцентной спектроскопии показано, что d(AGGG(TTAGGG))₃ принимает структуру квадруплекса смешанной топологии (3+1). Такая же структура образуется и в разбавленном растворе K⁺ (но не в присутствии ионов натрия). Изучение фрагмента теломерной ДНК, содержащего 8 и 12 G-трактов, выявило, что конформация квадруплексных единиц в длинном тяже отличается от конформации изолированного G4. Концевой и внутренний квадруплексы преимущественно сосуществуют в виде двухтетрадной антипараллельной «корзины» и структуры смешанной топологии с тремя G-тетрадными слоями, которые организованы в виде «бусин на нитке» [194]. Необычный двухтетрадный теломерный G4 антипараллельной топологии, связывающий только один катион в полости квадруплекса, зарегистрирован с помощью комбинации физико-химических методов и в работе [22] при экстремально низкой концентрации ионов калия или стронция.

Доказательство того, что в условиях *in vivo* теломеры складываются в антипараллельные G-квадруплексы разного типа, позволяет по-новому осмыслить данные, согласно которым не все конформации

G4 активно ингибируют удлинение теломер теломеразой, в том числе человеческой [18]. В частности, параллельные тетрамолекулярные G4 являются хорошими субстратами фермента из *Tetrahymena*; удлиняются теломеразой и параллельные внутримолекулярные квадруплексы. В то же время резистентными к элонгации под действием теломеразы являются внутримолекулярные антипараллельные квадруплексы, то есть те, которые постулировались в работе [194]. Именно такие G4, образованные одноцепочечным концом теломер, способны ингибировать теломеразу, действуя как супрессоры опухоли.

СТРУКТУРА И СТАБИЛЬНОСТЬ G4 В ПРОТЯЖЕННЫХ ТЕЛОМЕРНЫХ ДНК

В литературе последней декады имеются противоречивые данные о структурной организации и стабильности G-квадруплексов в таких ДНК *in vitro*. Данные КД и электрофоретических исследований свидетельствуют о том, что длинные теломерные последовательности преимущественно складываются во внутримолекулярные, а не межмолекулярные квадруплексы. Получены экспериментальные доказательства как модели «бусин на нитке», в которой индивидуальные G4 являются независимыми [194], так и модели, в которой G-квадруплексные единицы оказывают влияние друг на друга [111, 193, 337]. Результаты изучения с помощью техники лазерного пинцета поведения G-квадруплексов, образованных фрагментом ДНК, который содержал 24 повтора d(TTAGGG), то есть имел длину, сравнимую с полной одноцепочечной теломерной ДНК человека, показали, что только 5% G4 взаимодействуют между собой, образуя структуры более высокого порядка, в то время как подавляющее большинство квадруплексов ведут себя как «бусы на нитке» [162]. В публикации 2016 года отчасти объясняются противоречия, касающиеся организации мультиквадруплексных теломерных систем [31]. Оказалось, что реализация той или иной модели зависит от ионного состава среды. В K⁺-содержащих растворах G4-единицы преимущественно не оказывают влияния друг на друга, в то время как ионы натрия способствуют взаимодействию квадруплексных доменов. Именно эти взаимодействия делают квадруплексную структуру, образованную последовательностью d((GGGTAA)₇GGG), более стабильной в Na⁺-содержащих растворах, чем в присутствии KCl.

В литературе имеются разногласия и по поводу количества образующихся G4 на длинных теломерных последовательностях. Термодинамические исследования показали, что более 90 % олигонуклеотидов d(TTAGGG)₁₂ и d((TTAGGG)₁₂TT) складываются в

три соприкасающихся квадруплекса, то есть в структуры с максимально возможным числом G4, и только 10% формируют двухквадруплексную структуру [111]. Хотя, как отмечается, в случае очень длинных теломерных повторов (~200 нуклеотидных звеньев) образование максимального количества G4 становится энергетически невыгодным [111]. Прямая визуализация теломерных повторов d(TTAGGG)₁₆ методом атомной силовой микроскопии единичных молекул [197] поддержала модель «бусин на нитке», в которой G4 отделены участками одноцепочечной ДНК, что создает более гибкую структуру, в которой число квадруплексов не является максимально возможным. Такая недоукладка длинной теломерной ДНК обеспечивает возможность связывания защитного белка теломер POT1 с одноцепочечными фрагментами. Кроме белков защитного комплекса целый ряд ферментов, оперирующих на теломерной ДНК, требует свободного 3'-конца для своего связывания и дальнейшего функционирования. На системах *in vitro* был определен размер минимальной посадочной одноцепочечной площадки (6–12 нуклеотидов) для ферментов процессинга теломер [338]. Поскольку G-квадруплексы наиболее охотно образуются именно у 3'-конца ДНК [197], и при движении к 5'-концу теломерной последовательности вероятность складывания в квадруплексные структуры уменьшается (от 55% до 21.8, 14.5 и 7.9% для 1-ой, 2-ой, 3-ей и 4-ой позиции G4, соответственно), то длина одноцепочечного 3'-концевого участка может варьировать от 0 до 18 нуклеотидов (три повтора d(TTAGGG)) в случае теломерной ДНК человека [197]. В работе [338] отмечается, что размер этого участка, как результат координированного действия процессов образования G4 и его расплетания хеликазами, влияет на удлинение теломер под действием теломеразы или ДНК-полимеразы (в рамках механизма ALT).

G-КВАДРУПЛЕКСЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ НУКЛЕОТИДНЫМИ ЗВЕНЬЯМИ

В ряде статей и обзоров последнего времени изучалось влияние аналогов гуанина (2-аминопурина, 8-бром- и 8-метилгуанина, гипоксантина и др.), замещенных или модифицированных остатков рибозы (LNA), модифицированных негуаниновых оснований в G4-мотиве на тип складывания и стабильность внутри- и межмолекулярных G-квадруплексов [339–341], а также на функционирование белков, узнающих четырехспиральные структуры [342]. Отмечено, что некоторые типы повреждений ДНК могут действовать как модуляторы образования G4. Детально обсуждается эффект природных модифи-

каций оснований (окислительные повреждения, апуриновые сайты, алкилированные производные и др.), локализованных в петлях и в квадруплексном коре теломерных G4 человека [343–345]. Аналоги оснований, замещающие гуанины в тетраде, как правило, значительно дестабилизируют G4. Модификации в петлях изменяют структуру квадруплекса и его устойчивость менее драматично; при этом эффект зависит от типа повреждения и его положения в нуклеотидной последовательности. Так, апуриновые сайты в петлях ДНК G4 облегчают образование пропеллерных петель и стабилизируют параллельную топологию четырехспиральной структуры [346]. А 8-ОхоА или слегка дестабилизирует, или стабилизирует G4 в зависимости от локализации окисленного основания. Следует отметить, что процесс репарации природных повреждений в теломерных G-квадруплексах остается малоизученным.

IX. G-КВАДРУПЛЕКСЫ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ В ПРОМОТОРНЫХ УЧАСТКАХ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ

Методами биоинформатического анализа показано, что более 40% генов, кодирующих человеческие белки, содержат хотя бы один G4-мотив в промоторном районе. Наиболее распространенными объектами для исследования стали G4-мотивы, расположенные в промоторных участках онкогенов человека и генов белков, экспрессирующихся в опухолевых клетках или задействованных в процессах опухолевого ангиогенеза, неограниченной репликации, дисрегуляции апоптоза и метастазирования: *c-Myc* [113, 138, 140, 157], *Bcl-2* [87], *c-Kit-1*, *c-Kit-2* [142, 347, 348], *c-Myb*, *WT1* [349], *VEGF* [114, 350], *VEGFR-2* [351], *RET* [352], *Rb*, *HIF-1 α* , *KRAS*, *PDGF-A* [353] и *PDGFR- β* [354], фактора транскрипции *Nrf2* [227], *SRC* [203], а также в промоторе генов ВИЧ-1 [99, 355], 3'-проксимальном промоторном участке гена тирозингидроксилазы (*TH*) человека, связанной с неврологическими расстройствами [356], промоторе гена теломеразной обратной транскриптазы человека (*hTERT*) [357, 358]. С определенными оговорками к этой категории можно отнести и минисателлитные повторы из инсулин-связанного полиморфного района (ILPR), который локализован «выше» инсулин-кодирующей последовательности на 363 пары нуклеотидов [359].

Для исследования *in vitro* вторичных структур, образованных G4-мотивами из промоторов генов, обычно использовали олигонуклеотиды, содержащие четыре подряд G-тракта из изучаемой последовательности, иногда с прилегающими участками [45]. Как

показано методами ЯМР-спектроскопии, КД и химического пробинга, такие олигонуклеотидные модели, как правило, складываются в растворах K^+ в параллельные внутримолекулярные квадруплексы [8, 227, 350], хотя в некоторых работах отмечается конформационная гетерогенность образующихся структур. Обычными чертами доминирующих в популяции параллельных G4 являются три G-тетрады, соединенные двумя однонуклеотидными петлями (первая и третья) и варибельной по длине средней петлей [323, 350, 360]. Так, для квадруплекса *c-Мус* характерны петли 1:2:1, а для G4 *VEGF* – 1:4:1 [350]. Несмотря на отмеченные общие черты промоторных квадруплексов, предполагается, что каждый G4 может принимать уникальную структуру за счет взаимодействия нуклеотидов средней петли с фланкирующими последовательностями [350]. Конформацию G4 из промоторных участков генов изучали также методом РСА [361]. При этом было выявлено, что дихотомия между структурой в кристаллическом состоянии и в растворе, свойственная теломерным квадруплексам, не распространяется на другие эукариотические G4.

Поскольку многие G4-мотивы в промоторных районах содержат более чем четыре G-тракта, они могут образовывать несколько дискретных квадруплексов в зависимости от того, какая комбинация G-трактов используется в исследованиях *in vitro*, ее длины и наличия или отсутствия фланкирующих участков. Различные формы G4 могут находиться в динамическом равновесии друг с другом [138, 350]. В работе [138] оценен набор квадруплексных конформеров, образующихся в промоторе *c-Мус*, а также влияние петель и фланкирующих последовательностей на термодинамическую стабильность и кинетику сборки G4. Зависимость полученных результатов от выбранной последовательности ярко иллюстрируется на примере промоторного участка P1 гена *Bcl-2*. 39-звенная G-богатая последовательность (Pu39) содержит шесть G-трактов из 3–5 последовательных остатков гуанозина. Изучение конформационного потенциала набора олигонуклеотидов (более коротких, чем Pu39) с частично перекрывающимися последовательностями, содержащими по четыре идущих подряд G-тракта, показало, что они могут формировать различные квадруплексные структуры, с которыми с разной степенью селективности могут связываться квадруплекс-специфичные лиганды [362, 363]. Причем эти G4 не являются параллельными, выпадая из общей закономерности, а представляют собой квадруплексы смешанной топологии (3+1). Из них наиболее стабильным является MidG4, образованный четырьмя центральными G-трактами. Однако, когда в качестве модели исполь-

зовался полноразмерный Pu39, то превалирующая структура, в которую он складывался, представляла собой внутримолекулярный параллельный квадруплекс с двумя однонуклеотидными петлями и средней 13-нуклеотидной петлей. В образовании этого квадруплекса, как было показано методами химического футпринтинга и ЯМР-спектроскопии, участвовали G-тракты I, II, IV и V, а гуанозинового остатка G-тракта III входило в состав средней длинной петли [87]. Причем полноразмерный параллельный G4 оказался даже более термодинамически устойчивым, чем MidG4. Присутствие нескольких разных по топологии квадруплексов в одном и том же регуляторном участке может оказаться важным для прецизионной модуляции экспрессии гена, опосредованной связыванием различных G4 с разными белками. Согласно последним данным, вблизи промотора P1 гена *Bcl-2* найдена другая 28-звенная G4-образующая последовательность, P1G4, которая может складываться при физиологических условиях в два параллельных G4, которые находятся в состоянии равновесия друг с другом. С помощью ЯМР-спектроскопии и химического футпринтинга показано, что один из квадруплексов содержит две однонуклеотидные петли и 12-звенную среднюю петлю, в то время как другой имеет необычную конформацию с тремя однонуклеотидными петлями и 11-звенным участком, выпетленным из G4-кора [364]. При этом в обоих квадруплексах длинные петли принимают структуру шпильчатого дуплекса, который отличает их от других параллельных G4 и может специфически узнаваться малыми молекулами. Авторы полагают, что присутствие Pu39 и P1G4 в соседних районах промотора P1 обеспечивает дополнительный механизм регуляции транскрипции гена *Bcl-2*. При этом последовательность P1G4 играет доминирующую роль в репрессии транскрипционной активности [364].

В обзоре 2010 г. [70] рассматриваются разнообразные G4, образующиеся в промоторах генов, и приводится их классификация. Предложены 4 класса внутримолекулярных квадруплексов: (1) единичные G4, (2) пара различных G4, разделенных участком из ~30 пар нуклеотидов, (3) тандем из двух G4, взаимодействующих друг с другом, (4) множественные G4, образованные перекрывающимися G4-мотивами. В некоторых статьях приводятся доказательства взаимодействия между квадруплексами, образованными последовательностями из промоторных участков со множественными G-трактами [358, 365]. Образование ассоциатов может быть характерной чертой структурной организации промоторных G4, поскольку именно параллельные G4 имеют склонность к «слипанию» друг с другом. Наиболее подробно было изучено взаимодействие между квадруплексными

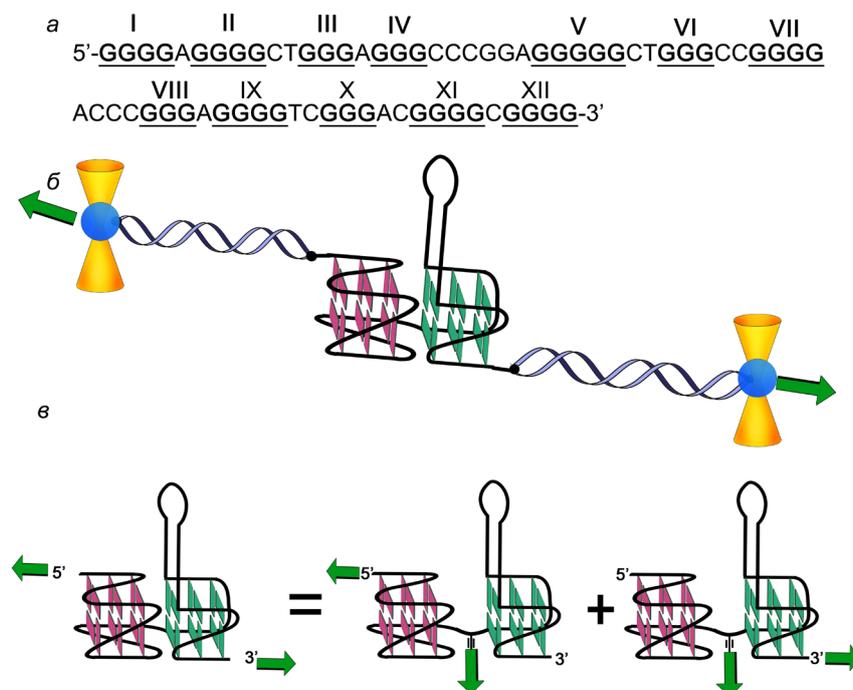


Рис. 7. Оценка энергии взаимодействия между двумя квадруплексами, образованными промоторным участком гена *hTERT*, содержащим 12 G-трактов (а), с помощью техники лазерного пинцета (б). Для механического разрушения-сборки желаемого домена биомолекулы была использована реакция алкин-азидного циклоприсоединения; алкиновая группа была помещена между двумя анализируемыми G4, что позволило адресно присоединить дуплексный фрагмент, содержащий азидогруппу. Растягивание-релаксация разных комбинаций ДНК-дуплексов (показаны зелеными стрелками), иммобилизованных на оптически-перемещаемые шарики, дало возможность наблюдать за динамикой конформационных переходов и энергетикой процесса в тандеме квадруплексов и в каждом G4-компоненте отдельно (в). Лазерные лучи, сфокусированные на шариках, представлены желтыми конусами.

структурами, образованными промоторным участком гена *hTERT*, содержащим 12 G-трактов (рис. 7а). Следует отметить, что в литературе имеются противоречивые мнения по поводу количества G4, образованных этой последовательностью. С одной стороны, приводятся доводы в пользу существования трех параллельных G4, взаимодействующих между собой за счет стэкинг-взаимодействий концевых G-тетрад [358]. С другой стороны, декларируется образование двух-

квадруплексной системы, в которой компоненты образуют единую структуру; методами КД, ингибирования Taq-полимеразы, химического футпринтинга и оптического пинцета показано формирование параллельного G4 четырьмя последовательными G-трактами (I–IV) и квадруплекса необычной конформации, образованного двумя парами последовательных G-трактов (V, VI и XI, XII), которые отделены 26-звенной петлей (тракты VII–X) (рис. 7б). Эта петля вероятно образует стабильную шпильку, что может объяснить высокую устойчивость атипичного квадруплекса [195]. В работе 2016 г. [195] прямое доказательство взаимодействия между двумя G4 представлено с помощью техники лазерного пинцета. Этот подход был модифицирован таким образом, чтобы последовательно наблюдать за динамикой конформационных переходов в отдельных G4-компонентах, избегая нарушения межквадруплексных контактов. Для таргетирования желаемых доменов биомолекулы была использована реакция алкин-азидного циклоприсоединения с алкиновой группой, помещенной между двумя анализируемыми G4. Это позволило целенаправленно присоединить дуплексный фрагмент, содержащий азидогруппу, и отдельно наблюдать механическое разрушение–сборку одного из квадруплексных компонентов, оставляя другую часть биомолекулы свободной от механического стресса (рис. 7в). По мнению авторов, этот подход имеет существенные преимущества перед использованием мутантов, в которых отсутствует один из квадруплексных доменов. Разработанный ими анализ квадруплексных структур более высокого порядка дал возможность определить иерархию процесса разрушения анализируемой системы (сначала развертывается более слабый G4 на 5'-конце молекулы, потом – устойчивый 3'-концевой G4 со структурированной средней петлей), а также оценить стабилизационную энергию π - π взаимодействий между концевыми G-тетрадами в межквадруплексном интерфейсе (2 ккал/моль) [195]. Следует отметить, что в этой работе G4-мультимеры рассматриваются как элементы третичной структуры, которая, в отличие от белков и РНК, несвойственна геномной ДНК. Обычно выводы о пространственной организации множественных G4 базируются на знании структуры составляющих их квадруплексных единиц. В работе [359], посвященной прямому доказательству взаимодействий между двумя G4, образованными последовательностью ILPR человека d(ACAGGGGTGTGGG)_n, показано, что этот принцип не соблюдается. С помощью техники лазерного пинцета и химического футпринтинга получены данные, свидетельствующие о том, что конформация, адаптированная внутримолекулярными мультиквадруплексами, не может

быть автоматически предсказана на основании структуры индивидуальных G4, а охарактеризованные межквадруплексные взаимодействия отличаются от тех, которые наблюдались в теломерных последовательностях. Наличие «третичных» взаимодействий между соседними G4 может иметь важные биологические последствия. Протяженные жесткие квадруплексные структуры могут приводить к более серьезным ошибкам в процессах репликации, создавать новые мишени для G4-специфичных лигандов и клеточных белков и обеспечивать более тонкий уровень регуляции генной экспрессии.

Считается, что в образовании внутримолекулярных G4 участвуют тандемно расположенные G-тракты из идущих подряд трех или более остатков гуанозина, которые формируют «ребра» квадруплексного кора, а соединяющие G-тракты линкерные последовательности становятся петлями квадруплекса. Но недавно методами ЯМР-спектроскопии и РСА было обнаружено исключение из этого правила. Последовательности Pu24 и c-Kit87 из человеческих промоторов *c-Myc* и *c-Kit* [361], соответственно, могут складываться в необычные G4. Характерной чертой таких квадруплексов является то, что ход гуанозинов в одном из «ребер» прерывается несмотря на присутствие четырех полноценных G-трактов. Так, изученная *in vitro* структура, которую образует c-Kit87, обладает уникальной топологией, не похожей ни на один известный G4. Несмотря на наличие четырех трактов (GGG) в последовательности c-Kit87: d(A₁G₂G₃G₄A₅G₆G₇G₈C₉G₁₀C₁₁T₁₂G₁₃G₁₄G₁₅A₁₆G₁₇G₁₈A₁₉G₂₀G₂₁G₂₂), что позволяло предположить образование стандартного параллельного G4, в формировании одного из «ребер» реально детектируемого квадруплекса задействован отдельно стоящий остаток G₁₀ и только два из трех гуанозинов, G₂₁ и G₂₂, G-тракта около 3'-конца молекулы. Необычные квадруплексные структуры, образуемые 32-звенным олигонуклеотидом d(G₁C₂G₃G₄T₅G₆T₇G₈G₉G₁₀A₁₁A₁₂G₁₃A₁₄G₁₅G₁₆G₁₇A₁₈A₁₉G₂₀A₂₁G₂₂G₂₃G₂₄G₂₅G₂₆A₂₇G₂₈G₂₉C₃₀A₃₁G₃₂) из промотора гена *KRAS* были зарегистрированы в 2016 г. методами ЯМР-спектроскопии, КД и др. [366]. Этот олигомер в растворе K⁺ складывается в два димерных квадруплекса при 5'- и 3'-концах молекулы; при этом центральный сегмент A₁₁-A₂₁, несмотря на обогащенность остатками G, только соединяет две квадруплексные единицы. Одной из характерных черт этой структуры является то, что остаток C₂, нарушающий на 5'-конце G-тракт, выпетливается из квадруплексного кора. Описанный димерный G4 не может образоваться в геномном контексте, однако условия внутриклеточной «молекулярной толкучки», по мнению авторов, могут способствовать внутримолекулярной сборке квадруп-

лекса. В более ранних работах показано, что олигонуклеотиды разной длины из промоторного района гена *KRAS* складываются в растворе КС1 в G4 разной топологии, включая и мономерные формы [367].

ВЛИЯНИЕ ПРОМОТОРНЫХ G4 НА ГЕННУЮ ЭКСПРЕССИЮ

Более приближенными к условиям *in vivo* являются плазмидные конструкции, в которые вставлены G-богатые промоторные участки или их фрагменты. Ведь в отличие от одноцепочечных теломерных концов образование G-квадруплексной структуры в промоторных районах происходит в конкуренции с сохранением двойной спирали и регулируется уровнем сверхспирализации ДНК и связыванием с G4-узнающими белками. Только в отрицательно сверхспирализованных геномных фрагментах (или в имитирующих их плазидах) образование G4 будет энергетически выгодным [113]. С помощью плазмидных моделей в концептуальной статье [113] предложен механизм регуляции транскрипции гена *c-Myc*, в котором существенная роль отводится G4. Во многих публикациях последнего времени постулируется участие G-квадруплексных структур, образующихся в промоторных районах, в ингибировании экспрессии онкогенов. Поэтому использование низкомолекулярных лигандов, которые специфически связывают и стабилизируют G4, является основой противоопухолевой стратегии [8, 229].

В недавних статьях с помощью репортерных конструкций показано сильное влияние положения G4 в промоторах генов эукариот на уровень транскрипции [368]. В то время как G4-мотив в антисмысловой (матричной) цепи существенно ингибирует транскрипцию, его локализация в смысловой (кодирующей) цепи не сказывается на эффективности этого процесса. При изучении роли G4 в экспрессии бактериальных генов были выявлены еще более сложные закономерности, связанные с позиционным эффектом G4-мотивов в регуляторных участках [369]. Авторы нашли, что степень ингибирования транскрипции при локализации G4 в антисмысловой цепи промоторного участка коррелирует со стабильностью квадруплекса. Однако, когда G4-мотив был введен в антисмысловую цепь между сайтом начала транскрипции (TSS) и стоп-кодоном, наблюдалось увеличение уровня генной экспрессии. Как предполагают авторы, G4, образующийся «ниже» промотора, облегчает разведение цепей двойной спирали ДНК, поддерживая расплетающую активность РНК-полимеразы. Усиление промоторной активности наблюдалось и в случае локализации G-богатой после-

довательности с семью G-трактами в 3'-проксимальной области промотора гена *TH* человека [356]. Полагают, что одной из причин активации промотора является образование такими G4-мотивами множественных квадруплексов, которые могут дифференцированно регулировать транскрипцию гена.

Из того факта, что генная экспрессия не чувствительна к наличию G4 в смысловой цепи промоторного района [368], следует, что квадруплексная структура в C-богатой антисмысловой цепи (i-мотив) либо не образуется внутриклеточно, либо не влияет на процесс транскрипции. Однако в других публикациях не исключается участие i-мотива в регуляции транскрипции. Так, методом молекулярной популяционной динамики и техники лазерного пинцета показано, что малые молекулы и белки, взаимодействующие с этой структурной мишенью, могут модулировать транскрипцию онкогена *Bcl-2* [370]. Высказывается предположение, что в то время как G4 может действовать как сигнал ингибирования экспрессии онкогенов, i-мотив способен активировать этот процесс [184].

В работе [371] проанализирована связь между точечными мутациями G4-мотивов, которые влияют на конформацию и стабильность квадруплексов, и вариациями в профилях генной экспрессии конкретных людей. Кроме развития направлений, ассоциированных с персонифицированной медициной, эти находки связывают с эволюционными аспектами. Полагают, в частности, что эволюционно-консервативными остаются элементы квадруплексного кода, в то время как мутациям подвергаются петли G4.

X. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РНК-КВАДРУПЛЕКСОВ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Как и последовательности ДНК, РНК-аналоги, содержащие G-тракты, способны при физиологических условиях складываться в квадруплексы, факторы стабилизации которых и пути сборки близки к таковым для ДНК-квадруплексов [372]. Как и для ДНК G4, основными детерминантами стабильности РНК-квадруплексов являются длина и нуклеотидная последовательность петель, концентрация ионов K^+ и Na^+ , количество G-тетрад [96, 373]. Поскольку молекулы рибонуклеиновой кислоты находятся обычно в одноцепочечном состоянии, образование РНК G4 должно происходить легче, чем в случае двуспиральной ДНК, так как спаривание с комплементарной последовательностью не будет конкурировать с процессом сборки квадруплекса. Однако отмечается, что нуклеотидный контекст является одним

из основных факторов, которые управляют сборкой G4 в молекулах РНК. В частности, наличие по соседству С-трактов, с которыми могут гибридизоваться G4-мотивы, препятствует образованию четверных спиралей РНК [95].

Большое количество G4-мотивов было идентифицировано в человеческом транскриптом. Согласно данным биоинформатического анализа они встречаются в 5'-нетранслируемых участках почти 2000 генов человека [374], а также в 3'-нетранслируемых сайтах [375]. G4-мотивы найдены в различных районах мРНК, кодирующих и некодирующих белки, например, в открытой рамке считывания определенных мРНК [376], участках альтернативного процессинга пре-мРНК, а также в пре-микроРНК [82], длинных некодирующих РНК [83], вирусных РНК. В работе [206] описан новый подход к детекции и картированию РНК G4 в клеточных транскриптах. Он основан на мониторинге остановок обратной транскриптазы, обусловленных образованием РНК G4; показано, что этот процесс коррелирует со стабильностью РНК-квадруплексов, которая контролируется ионами металлов и G4-специфичными лигандами. Перспективная стратегия обнаружения РНК G4 в различных условиях *in vitro*, в фиксированных и живых клетках, основанная на использовании флюорогенного цианинового красителя, разработана в статье [377].

Теломеры – специализированные ДНК-белковые структуры на концах эукариотических хромосом, долгое время считались транскрипционно неактивными. Однако, недавние исследования показали, что теломерные ДНК транскрибируются в клетках млекопитающих с образованием длинных некодирующих РНК (TERRA), которые содержат повторы последовательности 5'-UUAGGG-3'. Эти G4-мотивы существуют в виде квадруплексов в K⁺-содержащих растворах и *in vivo* [1, 57, 81, 378]. То, что человеческая TERRA способна складываться в стабильные G-квадруплексные структуры, было показано с помощью методов КД, ЯМР-спектроскопии, PCA и масс-спектрометрии [1, 125, 379]. Образование молекулами TERRA человека параллельных G4 в живых клетках было показано с помощью олигонуклеотидных проб со светопереключаемыми пиреновыми группами [1]. Для этого были сконструированы серии олигонуклеотидов, содержащих последовательность 5'-GGGUUAGGG с двумя G-трактами, к концам которых через гибкие линкеры были присоединены остатки пирена. В неструктурированном состоянии обе молекулы пирена были пространственно разнесены, и их флуоресцентный сигнал был слабым (мономерная эмиссия). При образовании бимолекулярного параллельного G4 в присутствии ионов K⁺ пиреновые молекулы на 5'- и

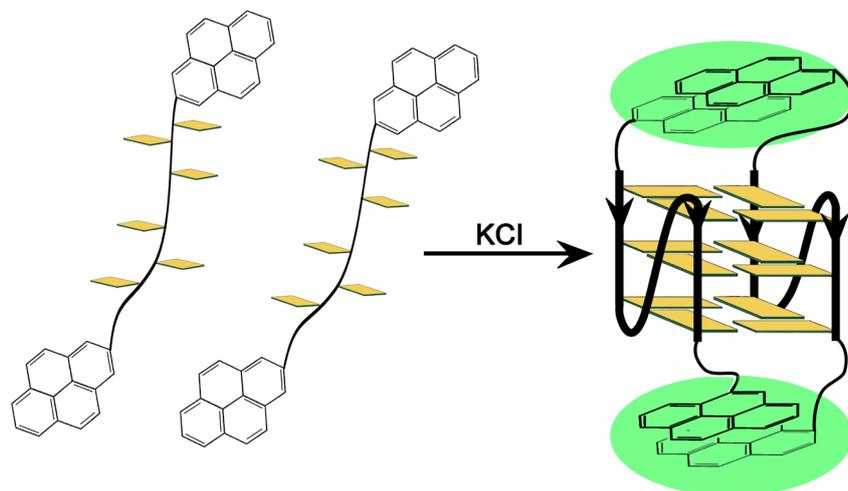


Рис. 8. Использование олигонуклеотидов 5'-GGGUAGGG с двумя G-трактами, содержащих остатки пирена на 5'- и 3'-концах, для доказательства образования параллельного бимолекулярного РНК G4. В неструктурированном состоянии флуоресцентный сигнал пирена слабый (мономерная эмиссия). При комплексобразовании пиреновые остатки сближаются, формируя флуоресцентно возбужденное эксимерное состояние (показано зелеными овалами).

3'-концах олигонуклеотидных проб сближались, формируя флуоресцентно возбужденное эксимерное состояние (рис. 8). Изменение в цвете эксимерной флуоресценции, наблюдаемой с помощью флуоресцентного микроскопа, позволило провести мониторинг образования G4 в режиме реального времени в клетках *HeLa*, инкубированных с олигонуклеотидными пробами.

В отличие от полиморфных ДНК-квадруплексов РНК G4 имеют только параллельную топологию [57, 380], причем это справедливо и для коротких олигонуклеотидных моделей [57, 81, 380], и для длинных теломерных РНК, образующих гирлянду внутримолекулярных квадруплексных структур [192]. Показано, что параллельная ориентация G-трактов в квадруплексах, образованных TERRA РНК, не зависит от нуклеотидной последовательности петель, природы одновалентных катионов (K^+ или Na^+), состояния образца (кристаллического или растворенного в водном буфере) и присутствия низкомолекулярных лигандов [379, 381]. Известно, что в G4 параллельной топологии все гуанозины, входящие в состав тетрад, имеют *анти*-конформацию, в то время как в антипараллельных G4 половина остатков имеют *анти*-, а половина – *син*-конформацию. Поэтому

конформационные предпочтения нуклеозидов (*син-анти*) могут определять взаимное расположение цепей в квадруплексе. Поскольку в олиго- и полирибонуклеотидах остатки rG находятся преимущественно в *анти*-конформации из-за стерических ограничений, налагаемых 2'-гидроксильной группой, а dG охотно принимают и *син*-конформацию, для квадруплексов, в состав которых входят рибонуклеотидные звенья, будет характерна параллельная топология. Переключение антипараллельного G4, образованного аптамером к тромбину: 5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG), в квадруплекс параллельной топологии было достигнуто путем частичной или полной замены остатков dG на rG. Более того, эта замена привела к конвертации мономолекулярного G4 в бимолекулярный из-за несовместимости длины петель квадруплекса с параллельной внутримолекулярной укладкой рибо-версии аптамера [382].

РНК-квадруплексы обычно более стабильны, чем G4, образованные такой же ДНК-последовательностью [380]. Так, для РНК-квадруплекса, содержащего три G-тетрады и однонуклеотидные петли, $T_{пл}$ и ΔG (при 310 К) в растворе с 15 мМ концентрацией ионов металлов составляют 359 К и 9 ккал/моль, соответственно, против 350 К и 5 ккал/моль для ДНК-аналога [131]. Причиной этого является скорее разница в свойствах двух нуклеиновых кислот, чем различие в топологии складывания квадруплексов [57, 380, 383]. Наличие 2'-ОН-группы играет значительную роль в организации гидратной оболочки в бороздках четверной спирали, в образовании сети водородных связей и конформации остатков сахара. Согласно данным молекулярного моделирования дополнительные Н-связи с участием 2'-ОН-групп и электроноакцепторных центров, таких как кислородные атомы сахарофосфатного остова (O3', O4', O5') и полярные экзоциклические группы оснований (NH₂-группа), вносят значительный вклад в стабилизацию квадруплексов параллельной топологии [381]. Кристаллографические исследования показали, что остатки сахара в гуанозинах концевых тетрад имеют C2'-эндо-конформацию, в то время как для гуанозинов в центре квадруплекса характерна C3'-эндо-конформация, что значительно отличается от соответствующих параметров ДНК-квадруплекса [381]. Эти находки согласуются с данными ЯМР-спектроскопии и компьютерного моделирования [381]. Как и у ДНК G4 термодинамическая стабильность РНК-квадруплексов уменьшается с увеличением длины петель [96], причем этот эффект, с одной стороны, более выражен, а с другой – подчиняется более сложным закономерностям, чем в случае ДНК-аналогов [96, 384]. В работах [96, 373] охарактеризованы особенности влияния числа нуклеотидных

остатков в петлях, длины G-трактов и концентрации ионов калия на термодинамическую стабильность РНК-квадруплексов и степень кооперативности их сборки (наличие промежуточных структур); при этом топология РНК G4 остается неизменно параллельной. На примере последовательности $(GGGGCC)_n$ из транскрипта гена *C9orf72* показано, что в зависимости от концентрации РНК, длины повтора и наличия фланкирующих последовательностей олигонуклеотиды такого типа могут образовывать либо очень стабильные параллельные внутримолекулярные квадруплексы с пропеллерными петлями, либо параллельные тетрамолекулярные РНК G4 [385]. Недавно был предложен механизм, согласно которому образование G4 в длинном повторе (GGGGCC) и на уровне ДНК, и РНК инициирует молекулярный каскад нейродегенеративных расстройств [292].

Некоторые достаточно длинные молекулы РНК способны образовывать несколько устойчивых внутримолекулярных конформаций, которые сосуществуют друг с другом [386]. Так, конкуренцию образованию РНК G4 может составить двуспиральная шпильчатая структура [387]. На динамическое равновесие «квадруплекс–шпилька», охарактеризованное методом ЯМР-спектроскопии, влияет относительное количество одно- и двухвалентных металлов, которые в разной степени стабилизируют конкурирующие структуры. Показано, что сдвиг равновесия «шпильчатый дуплекс–РНК-квадруплекс», обусловленный содержанием ионов калия, регулирует созревание человеческой пре-микроРНК [82]. Смещать равновесие «квадруплекс–шпилька» могут также низкомолекулярные лиганды, способные разрушать или стабилизировать РНК-квадруплексы [387, 388]. Интересно, что некоторые лиганды по-разному влияют на G4 рибо- или дезоксирибонуклеотидной природы. Так, катионный порфирип TmPp4 стабилизирует ДНК G-квадруплекс, образованный G4-мотивом в промоторе *c-Myc*, ингибируя таким образом транскрипцию этого онкогена. Этот же лиганд оказывает противоположное действие на РНК G4 [236]. «расплетая», например, чрезвычайно прочный квадруплекс, образованный мРНК, которая кодирует белок МТ3–ММР, что приводит к смягчению эффекта супрессии и повышению уровня трансляции этой мРНК в эукариотических клетках [236]. В работе [235] для идентификации лигандов, селективно связывающихся с TERRA G4, но не с теломерным ДНК-квадруплексом, была использована реакция алкин-азидного циклоприсоединения *in situ*.

Конформационные переходы от дуплекса к G-квадруплексу под действием ионов металлов, олигодезоксирибонуклеотидов определенной первичной структуры, белков и др. являются движущей силой

переключения активности специально сконструированных рибозимов и ДНК-зимов [389–391].

Параллельные РНК-квадруплексы имеют сильную тенденцию к слипанию друг с другом [379, 381]. Так, олигонуклеотиды с двумя теломерными повторами $\gamma(\text{UAGGGUUAGGGU})$ образуют в K^+ - или Na^+ -растворах бимолекулярные параллельные квадруплексы, которые димеризуются за счет стэкинг-взаимодействия 5'-концевых G-тетрад. Отсутствие остатков UA на 5'-конце молекулы в еще большей степени способствует образованию димерных РНК-квадруплексов. Причем, как показано методом ЯМР-спектроскопии, в плоскости концевых G-тетрад оказываются еще по два остатка аденина из петель UUA, что увеличивает площадь стэкинг-контакта [81]. Предполагается, что гексада $\text{A}\cdot(\text{G}\cdot\text{G}\cdot\text{G}\cdot\text{G})\cdot\text{A}$ стабилизируется Н-связями между N1 аденина и 2'-ОН гуанозина [379]. Димеризация параллельных РНК-квадруплексов посредством стэкинг-взаимодействия гексад $\text{G}\cdot(\text{A})\cdot\text{G}\cdot\text{G}\cdot(\text{A})\cdot\text{G}$ отмечалась и для G4, образованного олигонуклеотидом $\gamma(\text{GGAGGAGGAGGA})$ в присутствии ионов калия. Способность РНК G4 к мультимеризации является важным фактором при формировании структур более высокого порядка в длинных последовательностях РНК [192]. Согласно масс-спектрометрическому анализу, молекулы TERRA образуют стабильные мультимерные G4. Высказано предположение, что они могут быть организованы как «бусы на нитке», в которых каждая бусина представляет собой либо единичный РНК G4, либо пару объединенных стэкинг-взаимодействием квадруплексов [192]. Такие РНК-квадруплексные димеры могут служить мишенями для лигандов, которые узнают взаимодействующие плоскости концевых G-тетрад, внедряясь между ними, или индуцируют появление плоских структур с большей гидрофобной поверхностью (типа октад $\text{A}\cdot\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{G}$) для более эффективного связывания [379]. Как было доказано спектральными методами и данными гель-электрофореза, последовательность $\gamma(\text{GGGUUGCGGAGGGUGGGC})$ из 5'-концевого района РНК (*hTERC*), входящей в состав теломеразы человека, складывается в растворе K^+ в G4-димер [392]. Особо отмечено, что термодинамически устойчивый внутримолекулярный параллельный РНК-квадруплекс содержит однонуклеотидное выпетливание (остаток цитидина, подчеркнутый в приведенной последовательности) в одном из «ребер» G4. Прямое экспериментальное доказательство образования РНК G4 в полноразмерной *hTERC* приведено и в работе [206].

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ РНК-КВАДРУПЛЕКСОВ

Исследования последних лет показали, что РНК G4 играют важную роль в клеточных процессах [275, 393]. Они могут участвовать в терминации транскрипции и в регуляции разных ступеней метаболизма РНК, в частности, пост-транскрипционной генной экспрессии, которая включает контроль времени полужизни мРНК, сплайсинг и полиаденилирование пре-мРНК [15, 394], а также процессы трансляции [372, 393, 395]. Складывание G4-мотива в последовательностях РНК в квадруплексную структуру, влияющую на процесс трансляции, может быть особенно важным в растениях и других организмах, в клетках которых в ответ на стресс изменяется концентрация ионов калия [373].

До недавнего времени G4, образованные в разных участках мРНК, рассматривали как сеть репрессоров трансляции. Было показано, что РНК G-квадруплексы, локализованные в 5'-нетранслируемых сайтах мРНК, которые кодируют белки NRAS, Bcl-2, Zic-1, TRF2, MT3, ESR, ингибируют трансляцию, хотя точный механизм ингибирования этого процесса под действием РНК G4 не установлен. Отмечается, что уровень репрессии трансляции может достигать 50% (для большинства G4-мотивов) и даже 80%. РНК-квадруплексы, образованные в 3'-нетранслируемых районах [375] и в открытой рамке считывания мРНК, также ингибируют элонгацию трансляции *in vitro* и уменьшают выработку белка в клетках [376]. Показано, что G4, локализованный в кодирующем районе мРНК, способен стимулировать сдвиг рамки считывания *in vitro* и в культуре клеток, причем этот эффект коррелирует со стабильностью квадруплекса, которая модулируется G4-связывающими малыми молекулами [396].

Для того, чтобы направленно ингибировать трансляцию определенных мРНК, была разработана следующая стратегия: в заданных участках мРНК, содержащих только два G-тракта, индуцировали образование бимолекулярного гибридного ДНК-РНК G4 с помощью модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов, чей дизайн позволял адресно добавить недостающие для формирования G-квадруплексов G-тракты [397]. Используя в качестве мишени мРНК, кодирующую белок eIF-4E, который активно экспрессируется в различных злокачественных опухолях, было показано, что индуцированное тиофосфатными производными олигонуклеотидов образование G-квадруплексов в 5'-нетранслируемом участке и в белок-кодирующей области мРНК eIF-4E приводило, соответственно, к 30- и 60-процентному ингибированию экспрессии этого белка в раковых клетках человека [397]. Напротив, добавление антисмысловых олигонуклеотидов

(комплементарных G4-мотиву) может приводить к разрушению РНК G4 [398]. Влияние антисмысловых пептидных нуклеиновых кислот на процесс сборки РНК-квадруплексов *in vitro* с относительно высокой степенью дискриминации между различными G4-мотивами описано в работе [399]. Этот подход – «расплетание» РНК G4 с помощью 17–19-звенных олигонуклеотидов, был успешно использован для двукратного изменения уровня ингибирования трансляции определенной мРНК в человеческих клетках [400].

Однако недавно показано, что модуляция трансляции зависит от нуклеотидного контекста, в котором находятся G4-мотивы. Сформированные РНК-квадруплексы могут как ингибировать, так и активировать генную экспрессию в зависимости от их локализации в 5'-нетранслируемом участке мРНК [393, 401, 402]. Предполагается, что соседние нуклеотидные последовательности, внутриклеточное окружение и взаимодействующие партнеры могут влиять на функции G4 в клетке. Действительно, когда РНК G4 локализован в IRES-элементах, он обеспечивает новый механизм кэп-независимой инициации трансляции [403]. В работе [404] обнаружено прямое участие РНК-квадруплекса, образованного в IRES мРНК, кодирующей белок VEGF человека, во взаимодействии с рибосомной субъединицей 40S. В обзоре 2015 года обсуждается роль РНК G4 в регуляции процесса и функционирования некодирующих РНК, новых объектов исследования, перспективных для изучения функций G4 в контексте различных нейродегенеративных заболеваний [20].

Несколько публикаций последних лет посвящены изучению биологических функций теломерных повторов TERRA и квадруплексных структур, образуемых этими некодирующими РНК. В частности, показано, что TERRA не только аккумулируется в клеточном ядре, но и колокализована с теломерной ДНК на концах хромосом (метод FISH, Fluorescence In Situ Hybridization) и с белками защитного комплекса теломер (иммунофлуоресцентный анализ) [1]. Доказательством того, что TERRA является ключевым компонентом теломерной машины, служит участие белка защитного комплекса теломер TRF2 в одновременном связывании с TERRA в виде квадруплекса и с теломерной ДНК в виде дуплекса или G4 (метод ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) [267]. При этом одна молекула TERRA, которая способна складываться в гирлянду квадруплексов [192], может взаимодействовать с несколькими молекулами белка TRF2 [267]. Предполагается, что TERRA репрессирует собственную транскрипцию и участвует в поддержании структуры теломер и в образовании гетерохроматина [405]. Показано, что TERRA вызывает изменение

генной экспрессии в раковых клетках человека *in vivo*. В частности, теломерная РНК, образующая G4, ингибирует экспрессию генов, связанных с системой врожденного иммунитета, влияя тем самым на злокачественность опухоли [406].

Интересно, что повторы TERRA, 5'-UUAGGG-3', комплементарны последовательности теломеразной РНК. Используя реконструированную *in vitro* теломеразу и синтетическую молекулу TERRA, было показано, что повторы TERRA гибридизуются с РНК фермента и ингибируют его активность. Однако ингибирующее действие TERRA на теломеразу может быть смягчено *in vivo* гетерогенным ядерным рибонуклеопротеином A1 (hnRNPA1), вовлеченным в контроль длины теломер [407]. Предполагается, что ферментативное удлинение теломерных концов требует сбалансированного уровня TERRA и белка hnRNPA1, которые действуют как регуляторы активности фермента. Роль G-квадруплексов в биологии РНК, в частности, теломерных повторах TERRA и теломеразном РНК-компоненте *hTERC*, обсуждается в недавних обзорах [394, 408].

В прикладном плане интересна работа, в которой G4-содержащий РНК-аптамер, полученный селекцией *in vitro*, активирует флуоресценцию лиганда, имитирующего зеленый флуоресцирующий белок [409]. Недавно был разработан подход, основанный на замене пиримидиновых остатков в петлях теломерных G4 на флуоресцирующие 5-бензофурановые производные 2'-дезоксинуридина и уридина, который позволил создать включаемые флуоресцентные пробы для дискриминации ДНК-квадруплексов разной топологии и параллельных РНК G4 [410]. Такие G4-сенсоры были также использованы для оценки специфичности и сродства низкомолекулярных лигандов к квадруплексам разной химической природы и конформации.

XI. ГИБРИДНЫЕ ДНК–РНК G-КВАДРУПЛЕКСЫ

Функционально важными являются также гибридные ДНК–РНК G-квадруплексы. В работе [411] впервые исследована возможность ассоциации между теломерной ДНК и TERRA путем образования гибридного ДНК–РНК квадруплекса параллельной топологии. Формирование таких структур *in vitro* было доказано рядом независимых и дополняющих друг друга методов на олигонуклеотидных моделях. Для доказательства образования гибридных G4 в клеточной среде теломерные ДНК- и РНК-олигонуклеотиды, меченные различными флуорофорами (FAM и Cy3) по 3'-концам, были трансфицированы в клетки *HeLa*. Наблюдаемое изменение цвета регистрируемого сигнала

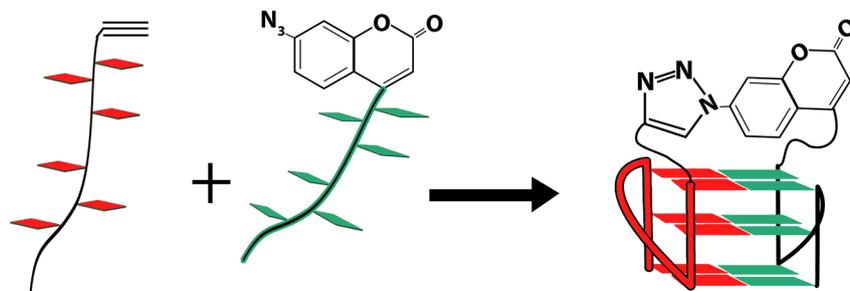


Рис. 9. Доказательство образования ДНК–РНК гибридных теломерных G4 в клетках *HeLa* с помощью реакции алкин-азидного циклоприсоединения.

12-звенная ДНК с двумя теломерными повторами (остатки G обозначены зеленым цветом) содержала остаток азидокумарина на 5'-конце, в котором флуоресценция погашена из-за влияния электронобогатого α -азота азидогруппы, а 12-звенная РНК (остатки G – красные) – 5'-алкиновую группу. Синтез триазолового кольца при добавлении медного катализатора сопровождался появлением сильного флуоресцентного сигнала из-за исчезновения эффекта гашения.

при колокализации флуорофоров служило доказательством их сближения в гибридном бимолекулярном квадруплексе. Если бы ДНК- и РНК-пробы не взаимодействовали друг с другом, то наблюдалось бы два различных флуоресцентных сигнала. Дополнительное блестящее доказательство образования гибридных теломерных G4 в живых клетках базировалось на использовании химического подхода [411]. Проба ДНК (12-мер с двумя теломерными повторами) содержала остаток азидокумарина на 5'-конце, а 12-звенная РНК – 5'-алкиновую группу. Азидокумарин был выбран в качестве профлуорофора, в котором флуоресценция погашена из-за влияния электронобогатого α -азота азидогруппы. Но синтез триазолового кольца в результате алкин-азидного циклоприсоединения сопровождается появлением сильного флуоресцентного сигнала из-за исчезновения эффекта гашения (рис. 9). Таким образом, разгорание флуоресценции будет свидетельствовать об образовании гибридного параллельного G4, в котором реакция циклоприсоединения инициирована за счет сближения реакционноспособных групп на концах РНК- и ДНК-олигонуклеотидов. Действительно, при добавлении клеточной среды, содержащей медный катализатор, к инкубированным с олигонуклеотидными пробами клеткам *HeLa* наблюдается (с помощью флуоресцентного микроскопа) яркое голубое свечение. Доказано, что простая молекулярная колокализация олигомеров не инициирует

реакцию циклоприсоединения. Тот факт, что этот метод был успешно использован для доказательства образования гибридного РНК–ДНК G4 в растворе *in vitro*, подтверждает данные клеточного эксперимента [411]. В еще более приближенной к нативным условиям системе наблюдалось образование гибридных G4 между природной теломерной РНК (TERRA) и содержащим теломерные повторы олигодезоксирибонуклеотидом с флуоресцентными метками на обоих концах. Проба была сконструирована так, чтобы образовать в отсутствие мишени шпильчатую структуру, в которой флуоресценция FAM погашена тушителем DABCYL, находящимся на другом конце молекулы. Образование гибридного квадруплекса с теломерной РНК вынуждает «ДНК-шпильку» раскрыться, разнеся флуорофор и тушитель, что приводит к разгоранию флуоресценции. Этот эффект наблюдался после проникновения ДНК-маяка в клетки *HeLa*, подтверждая внутриклеточное образование теломерного гибридного G4 [411]. В этой же работе было показано, что квадруплексы, включающие теломерные ДНК и РНК, могут вносить вклад в защиту теломерных концов. Известно, что теломерные одноцепочечные ДНК образуют гирлянду квадруплексов. Образование G4-структур более высокого порядка характерно и для теломерной РНК [381]. Межмолекулярное взаимодействие концевых повторов ДНК и РНК может приводить к образованию гибридного G4, который находится на стыке структурированных теломерных последовательностей ДНК и TERRA и обеспечивает защитный эффект посредством механизма стерических препятствий [411]. При этом известно, что теломерный белковый компонент TRF2 одновременно связывает G-квадруплексы ДНК и РНК, таким образом сближая их в клетке [267].

Гибридные ДНК–РНК G4 могут быть преобладающей формой квадруплексов и в процессе транскрипции. Они образуются из нематричной цепи ДНК и РНК-транскрипта [412]. Показано, что ДНК–РНК G4 модулируют транскрипцию в условиях *in vitro* и *in vivo* и что именно такие структуры являются основной формой G-квадруплексов, которые реализуются в процессе транскрипции. То, что РНК-транскрипт задействован в формировании гибридного G4, доказано тем, что эффект ингибирования транскрипции достигался при добавлении GTP, участвующего в синтезе РНК, а замена его на 7-дезаGTP, который не способен участвовать в образовании G-тетрады, восстанавливало уровень транскрипции. Эти результаты свидетельствуют о том, что межмолекулярные ДНК–РНК G4 в большей степени задействованы в регуляции транскрипции и связанных с ней процессов, чем внутримолекулярные ДНК-квадруплексы,

образованные матричной цепью двойной спирали [412]. Особенно важным представляется то, что в образовании гибридных G4 участвует только два G-тракта на нематричной цепи ДНК и, как показано методом биоинформатического анализа, эти мотивы гораздо более распространены в транскрибируемых районах генома, чем мотивы образования внутримолекулярных ДНК-квадруплексов, содержащих четыре и более G-тракта на матричной цепи [413]. Мотивы гибридных квадруплексов, являющихся эволюционно-консервативными [413], широко представлены в геномах теплокровных животных [414] и встречаются в более чем 97% генов человека [412]. Механизм сборки гибридных G4, ассоциированных с транскрипцией, дает возможность влиять на их образование и, как следствие, на уровень транскрипции. Так, присутствие C-богатых олигонуклеотидов, комплементарных РНК-транскрипту, препятствует образованию гибридных G4, а квадруплекс-специфичные лиганды стабилизируют такие структуры [414].

Согласно данным статьи [415] квадруплексные гибриды могут быть включены и в регуляцию синтеза ДНК, по крайней мере в митохондриях, где транскрипционная машина генерирует РНК-праймеры, необходимые для инициации репликации. ДНК нематричной цепи, содержащей фрагменты с G-богатой консервативной последовательностью 5'-GGGGAGGGGGG (два G-тракта) из митохондриальной ДНК человека, и образовавшийся транскрипт складываются вблизи точки начала репликации в стабильный гибридный G4 параллельной топологии. В таком квадруплексе 3'-конец праймера удален от матричной цепи и не доступен действию митохондриальной репликативной машины, что объясняет механизм негативной регуляции репликации ДНК. И только после расплетания G4 хеликазой (например, эволюционно-консервативной Pif1) освободившийся праймер может быть использован для инициации репликации ДНК. Обсуждается также участие гибридных квадруплексов в рекомбинации генов иммуноглобулинов и в протекании нейродегенеративных заболеваний, вызванных экспансией G-богатых повторов в генах *C9orf72* [416] и *FMRI* [417].

ХП. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК- И РНК-КВАДРУПЛЕКСОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК И В СИСТЕМАХ *IN VIVO*

Возможность образования в живых клетках биологически значимых G-квадруплексов, которые в отличие от других альтернативных структур ДНК устойчивы в физиологических условиях, было предметом научных дискуссий на протяжении десятилетий. Открытие лигандов, специфичных к G4, дало ключ к изучению биологических свойств таких структур, а также разработке методов их выделения и идентификации в клетках [205]. Анализ геномных G-квадруплексов проводился методом преципитации хроматина. Фрагменты хроматина фракционировали в зависимости от их сродства к квадруплекс-связывающим лигандам, а затем отобранные участки анализировали с помощью секвенирования или матричного анализа на микрочипах для определения их локализации в геноме. Идентификацию G4 в клеточных системах проводили и при помощи высокоспецифичных к таким структурам моноклональных антител [320].

Сложность тестирования G4 в живых клетках и неоднозначность интерпретации полученных результатов связана с рядом факторов. В системах *in vivo* существует множество белков и ферментов, которые могут взаимодействовать с неканоническими формами ДНК, стабилизируя или дестабилизируя такие структуры [418], а также расщепляя их. Участки генома, содержащие G4-мотивы, могут быть включены в состав нуклеосом, где они полностью экранированы гистонными белками. Переход данного участка генома в альтернативную конформацию зависит от факторов, влияющих на стабильность двойной спирали: степени метилирования и локального топологического состояния ДНК [419]. Следует учитывать также, что эксперименты *in vitro*, в которых анализировались квадруплекс-образующие последовательности, проводят в разбавленных растворах, то есть в условиях, которые резко отличаются от «молекулярной толкучки», характерной для систем *in vivo*. К тому же низкомолекулярные лиганды, стабилизируя квадруплексные структуры, могут смещать равновесие в сторону их образования, искажая тем самым реальную картину распределения таких неканонических форм в клеточной ДНК. Тем не менее, о прямом доказательстве существования G4 в промоторных участках генов было заявлено еще в 2002 году. Однако эта и подобные работы основывались на биологических эффектах вводимых в клетку G4-стабилизирующих лигандов. Важным прорывом в этой области было обнаружение с помощью флуоресцирующих антител G-квадруплексных структур

при теломерах в макроядрах инфузорий *Stylonychia lemnae*. Позднее было показано, что образование G4 зависело от стадий клеточного цикла и контролировалось белками, связывающимися с теломерными концами. Но только в исследованиях последних лет продемонстрирована возможность «увидеть» и картировать локусы в клетках млекопитающих, включая и клетки человека, которые принимают G-квадруплексную конформацию, и выяснить роль этих неканонических форм ДНК в каскаде биологических событий.

В работе [203] представлены две независимые линии доказательств того, что функционально важные G-квадруплексные структуры существуют в геномной ДНК опухолевых клеток. В первом подходе в качестве репера использовался низкомолекулярный лиганд пиридо-статин, способный связывать ДНК-квадруплексы вне зависимости от их топологии, распознавая основную детерминанту этой структуры. Показано, что под действием пиридо-статина возникают опосредованные транскрипцией и репликацией геномные повреждения, которые коррелируют со снижением уровня экспрессии ряда генов, содержащих G4-мотивы. Предполагается, что лиганд, стабилизируя G4, препятствует движению полимеразы вдоль двойной спирали, что приводит к разрыву ДНК, вызванному действующими на субстрат физическими силами или активностью эндонуклеаз. Для локализации пиридо-статин-связывающих сайтов был проведен иммуноферментный анализ клеток, обработанных лигандом, с антителами к клеточному маркеру поврежденных локусов. В независимой серии экспериментов был использован химический подход (реакция алкин-азидного циклоприсоединения флуоресцирующей группы к пиридо-статину) для того, чтобы непосредственно увидеть молекулы лиганда в клеточных ядрах в виде флуоресцирующих точек. Региоселективная реакция алкиновой группы, присоединенной к пиридо-статину, с азидной, находящейся на флуоресцентном красителе Alexa Fluor, инициировалась *in cellulo* под действием медного катализатора. С помощью микроскопа высокого разрешения были выявлены локусы образования G-квадруплексных структур в ДНК человеческих клеток и показано, что они локализованы преимущественно в районах, отличных от концов хромосом. Вторым репером выступала хеликаза hPif1, которая, как известно, обладает высокой селективностью к G4 и регулирует образование и процессинг таких структур в геноме. На линии клеток остеосаркомы человека, в которой экспрессировалась хеликаза, слитая с зеленым флуоресцирующим белком, было изучено распределение фермента в ядрах клеток по сравнению с

распределением флуоресцентно-меченного пиридопестина. Этот анализ показал, что и без обработки лигандом хеликазы связывается с G4-мотивами в геноме, и общий паттерн распределения светящихся точек был сравним с тем, который наблюдался для меченых малых молекул. В независимом эксперименте, в котором клетки фиксировали формальдегидом, «замораживающим» все биологические процессы, перед их обработкой пиридопестином, наблюдалось значительное перекрытие между геномными мишенями пиридопестина и хеликазы. Эти данные свидетельствуют о существовании предсформированных G4 в человеческих клетках, а не инициированных добавлением G4-связывающего лиганда.

Отмечено, что не все сайты с высоким содержанием G4-мотивов метились флуоресцирующим лигандом. По-видимому для того, чтобы G4-мотив сложился в квадруплекс, должны реализоваться дополнительные механизмы, которые способствуют этому процессу. Например, отрицательная сверхспирализация ДНК в определенном локусе или активность процессов репликации или транскрипции, которые сопровождаются локальным плавлением двойной спирали и кратковременным освобождением одноцепочечных участков для считывания полимеразы. Способность G4-мотива образовывать квадруплекс и связываться с лигандом может также зависеть от того, находятся ли G-богатые участки на транскрибируемой или нетранскрибируемой цепи ДНК [368] или, в случае репликации – на лидирующей или запаздывающей цепи. Также следует принимать во внимание, что причиной некоторых клеточных эффектов G4-специфичных лигандов может быть их взаимодействие с РНК G4 [420].

Прямая количественная визуализация ДНК G4 в опухолевых клетках человека с помощью квадруплекс-специфичных антител была описана в статье [318]. Визуализация достигалась путем амплификации флуоресцентного сигнала в сэндвиче из антител. О специфичности сигнала свидетельствовало исчезновение светящихся точек после предварительной инкубации антител с избытком олигонуклеотидных квадруплексов, а также при инкубации клеток с флуоресцентными антителами в отсутствие первичного G4-связывающего антитела. Локусы окрашивания в ядре также исчезали при обработке клеток ДНК-азой, но не РНК-азой. Локализация светящихся точек на концах хромосом в стадии метафазы подтверждает присутствие G4 на теломерных концах, а россыпь дискретных точек в других хромосомных локусах свидетельствует о том, что множество квадруплексных структур (примерно 75%) может образовываться в промо-

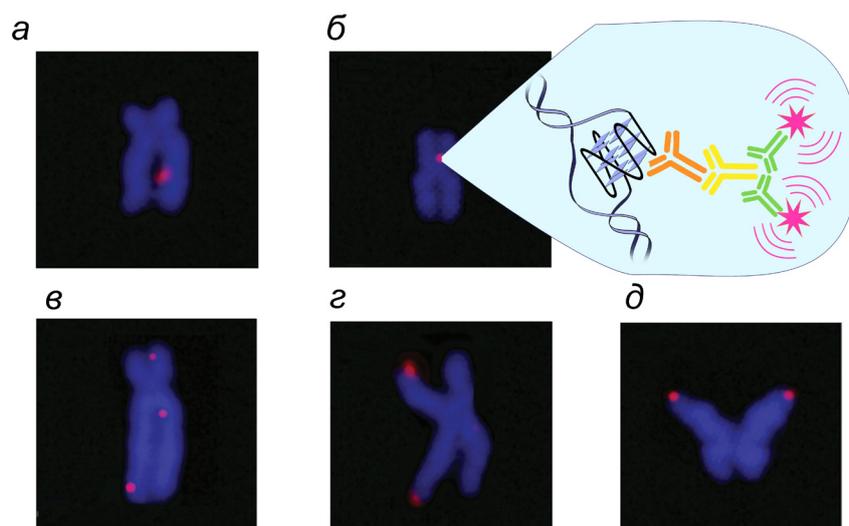


Рис. 10. Визуализация эндогенных ДНК G4 в метафазных хромосомах, выделенных из клеток *HeLa*, с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии (использование G4-специфичных антител BG4).

Флуоресцирующие точки фокусируются как во внутренних участках хромосом (а–в), так и при теломерных концах (г, д). Симметричное расположение точек в сестринских хроматидах (д) свидетельствует об образовании G-квадруплексов в тех же геномных сайтах во вновь синтезированной ДНК. Рисунок частично заимствован из рисунка 3 статьи [318].

торных районах и других участках ДНК, несмотря на присутствие конкурирующей комплементарной цепи (рис. 10). В этой блестящей работе показано, что образование G4 в ядрах клеток модулируется в зависимости от стадий клеточного цикла; максимум наблюдается в фазе активной репликации ДНК (S-фаза), который превышает уровень детекции G4 в стадии клеточного покоя в 4.8 раза. Согласно полученным данным, добавление низкомолекулярных лигандов, стабилизирующих эндогенные ДНК-квадруплексы, приводит к увеличению (в 2.9 раза) количества детектируемых квадруплексных мишеней в клеточном ядре, что свидетельствует о сдвиге равновесия дуплекс–G4 в сторону образования квадруплексов и открывает пути направленной регуляции клеточных процессов, таких как ингибирование экспрессии онкогенов.

Эти данные подтверждает работа другой научной группы [421], в которой также использовались высокоспецифичные G4-антитела. Под воздействием двух G4-стабилизирующих лигандов – теломестатина и ТМРyP4, наблюдалось повышение количества детектируемых G4 в ядрах человеческих клеток. Внутриклеточная оптическая визуализация ДНК G4 с помощью флюорогенных лигандов описана в работе [259]. Совсем недавно появилась статья [422], в которой приводятся прямые доказательства существования ДНК-квадруплексов в митохондриях клеток. Для визуализации квадруплексов с помощью конфокального микроскопа использовали флуоресцирующие G4-специфичные лиганды на основе производных карбазола, которые способны мигрировать из ядра в митохондрии злокачественных клеток. В случае же нормальных клеток они накапливаются в цитоплазме. Показано, что такие соединения стабилизируют G4 и, таким образом, ингибируют экспрессию митохондриальных генов, выступая в роли противоопухолевых агентов.

В дополнение к ДНК G4, растущее внимание сейчас приковано к рибонуклеотидным аналогам квадруплексов и их роли в биологии РНК [394]. Прямые доказательства формирования РНК-квадруплексов в человеческих клетках приведены в работе [319], в которой детекция G-квадруплексов производилась в клеточной цитоплазме с помощью G4-специфичных антител BG4. Предварительно методом ELISA было показано, что эти антитела узнают основные структурные детерминанты G4, эффективно связываясь и с ДНК-, и с РНК-квадруплексами. Эндогенные G4 были визуализированы с помощью флуоресцентной микроскопии в нормальных, иммортализованных и злокачественных клетках человека. Амплификация флуоресцентных сигналов достигалась путем использования сэндвича меченых антител; при этом первичным антителом служил BG4. С помощью описанного подхода были идентифицированы как внутриядерные сигналы, приписанные ДНК-квадруплексам, так и (при более длительной экспозиции) флуоресцентные сигналы, распределенные в цитоплазме всех изученных клеточных линий, которые соответствуют РНК G4. Цитоплазматическая локализация первичных антител BG4 была подтверждена прокрашиванием клеток флуоресцентным красителем CellMask green, который выявляет клеточные границы. Когда фиксированные пермеабелизованные клетки до добавления антител BG4 были обработаны РНК-азой А, сигналы квадруплексов в цитоплазме исчезали, что свидетельствовало о наличии G4 рибонуклеотидной природы. Наряду с иммунофлуоресцентным анализом для доказательства присутствия эндогенных РНК-квадруплексов

в человеческих клетках были использованы низкомолекулярные лиганды. Так, карбоксипиридостатин, который, как было показано с помощью химических подходов (алкин-азидное циклоприсоединение *in situ*) гораздо более эффективно связываются с РНК G4, чем с ДНК-аналогами [235], увеличивает (примерно в 2.4 раза) число G4 только в цитоплазме клеток, не влияя на количество ДНК-квадруплексов ядерной локализации. Недавно РНК G4 были обнаружены в живых клетках с помощью квадруплекс-специфичного соединения нового поколения, N-TASQ, сочетающего в себе функции «умного» лиганда и «умной» флуоресцентной пробы [263]. Такие соединения ведут себя как внутриклеточные молекулярные сенсоры, настроенные только на предсформированные G4. Они используют G4 как матрицу для самосборки искусственной G-тетрады, образование которой приводит к разгоранию флуоресценции. N-TASQ обладает уникальными свойствами, т.к. в отличие от квадруплекс-специфичных антител не требует фиксации и пермеабиллизации клеток. Показано, что в используемых условиях мишенью N-TASQ служат цитоплазматические РНК G4 (в свободном состоянии или, более вероятно, в виде сложных рибонуклеопротеидных субклеточных ансамблей), которые выявляются в виде интенсивных дискретных локусов в клетках рака молочной железы и остеосаркомы человека, а также мышиной меланомы. При этом клетки не были предварительно обработаны. Предполагается, что N-TASQ легко проходит через цитоплазматическую мембрану, накапливаясь в цитоплазме клеток в неденатурирующих физиологических условиях.

В работе [423] показано, что G4-специфичные антитела BG4 могут быть использованы для прокрашивания G4 в тканях человека с помощью иммуногистохимии. При этом наблюдалось значительное увеличение числа G4-позитивных ядер в тканях больных раком печени и желудка по сравнению со здоровыми тканями. Для выявления злокачественной трансформации клеток использовали также G4-связывающий флуоресцентный лиганд 3,6-бис(1-метил-4-винил-пиридил)карбазол дийодид [424]. Оказалось, что число сигналов возрастает в зависимости от степени клеточного перерождения, что делает этот подход перспективным для ранней диагностики онкологических заболеваний.

С помощью иммуноэлектронной микроскопии G-квадруплексные структуры были обнаружены в образцах из различных организмов: инфузорий, плоских червей, плодовых мушек и млекопитающих [425]. Оказалось, что локусы, окрашенные моноклональными антителами 1Н6, специфичными к ДНК G4 разной топологии, присутствуют в

гетерохроматине всех образцов. Показано, в частности, что сайты связывания антитела 1Н6 в полиденных хромосомах из слюнных желез дрозофилы были колокализированы с белками гетерохроматина. Обнаружено также, что в разных организмах соматические клетки гораздо более интенсивно окрашены, чем плюрипотентные стволовые клетки. Эти находки указывают на консервативную роль G4 в ядерной организации и клеточной дифференциации. По мнению авторов, G-квадруплексные структуры присутствуют в постмитотических клетках, а также в митотических хромосомах. Они могут существовать независимо от ДНК-репликации, транскрипции или рекомбинации, стимулируя генетическую нестабильность.

XIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних лет показали, что G4 существуют в геномных ДНК во всех фазах клеточного цикла. Эти неканонические структуры многолики. С одной стороны, они могут выполнять регуляторные функции в клетке, ингибировать экспрессию онкогенов, блокировать нежелательную элонгацию теломерных ДНК, контролировать уровень отрицательной сверхспирализации в геноме, служить мишенями противоопухолевых препаратов. Недавно впервые была выявлена роль G4 в эмбриональном развитии, наиболее контролируемом процессе в биологии позвоночных [426]. С другой стороны, образование G4 вызывает геномную нестабильность (геномные инверсии, рекомбинации, мутации, делеции и др.), связанные с онкологическими заболеваниями и неврологическими расстройствами. В настоящем обзоре сделана попытка представить современное состояние знаний об этих удивительных структурах, причем во всех изученных аспектах. Важнейшая информация о структуре и биологических функциях G-квадруплексов была получена с помощью новых методов исследования, характеристике которых в обзоре уделено особое внимание.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xu, Y., Suzuki, Y., Ito, K., Komiyama, M. (2010) Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14579–14584.
2. Huppert, J.L., Bugaut, A., Kumari, S., Balasubramanian, S. (2008) G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6260–6268.
3. Bochman, M.L., Paeschke, K., Zakian, V.A. (2012) DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 770–780.
4. Lipps, H.J., Rhodes, D. (2009) G-quadruplex structures: *in vivo* evidence and function, *Trends Cell Biol.*, **19**, 414–422.
5. Valton, A.L., Hassan-Zadeh, V., Lema, I., Boggetto, N., Alberti, P., Saintome, C., Riou, J.F., Prioleau, M.N. (2014) G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators, *EMBO J.*, **33**, 732–746.
6. Foulk, M.S., Urban, J.M., Casella, C., Gerbi, S.A. (2015) Characterizing and controlling intrinsic biases of lambda exonuclease in nascent strand sequencing reveals phasing between nucleosomes and G-quadruplex motifs around a subset of human replication origins, *Genome Res.*, **25**, 725–735.
7. Paeschke, K., Juranek, S., Simonsson, T., Hempel, A., Rhodes, D., Lipps, H.J. (2008) Telomerase recruitment by the telomere end binding protein-beta facilitates G-quadruplex DNA unfolding in ciliates, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 598–604.
8. Balasubramanian, S., Hurley, L.H., Neidle, S. (2011) Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **10**, 261–275.
9. Kruisselbrink, E., Guryev, V., Brouwer, K., Pontier, D.B., Cuppen, E., Tijsterman, M. (2008) Mutagenic capacity of endogenous G4 DNA underlies genome instability in FANCD1-defective C. elegans, *Curr. Biol.*, **18**, 900–905.
10. Beaume, N., Pathak, R., Yadav, V.K., Kota, S., Misra, H.S., Gautam, H.K., Chowdhury, S. (2013) Genome-wide study predicts promoter-G4 DNA motifs regulate selective functions in bacteria: radioresistance of *D. radiodurans* involves G4 DNA-mediated regulation, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 76–89.
11. Cahoon, L.A., Seifert, H.S. (2009) An alternative DNA structure is necessary for pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*, *Science*, **325**, 764–767.
12. Tarsounas, M., Tijsterman, M. (2013) Genomes and G-quadruplexes: for better or for worse, *J. Mol. Biol.*, **425**, 4782–4789.
13. Schiavone, D., Guilbaud, G., Murat, P., Papadopoulou, C., Sarkies, P., Prioleau, M.N., Balasubramanian, S., Sale, J.E. (2014) Determinants of G quadruplex-induced epigenetic instability in REV1-deficient cells, *EMBO J.*, **33**, 2507–2520.
14. Beaudoin, J.D., Perreault, J.P. (2010) 5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7022–7036.
15. Beaudoin, J.D., Perreault, J.P. (2013) Exploring mRNA 3'-UTR G-quadruplexes: evidence of roles in both alternative polyadenylation and mRNA shortening, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5898–5911.
16. Haider, S.M., Neidle, S., Parkinson, G.N. (2011) A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions, *Biochimie*, **93**, 1239–1251.
17. Bryan, T.M., Baumann, P., *G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. 2010: Humana Press. 276.
18. Yatsunyk, L.A., Bryan, T.M., Johnson, F.B. (2012) G-ruption: the third international meeting on G-quadruplex and G-assembly, *Biochimie*, **94**, 2475–2483.

19. Wu, Y., Brosh, R.M., Jr. (2010) G-quadruplex nucleic acids and human disease, *FEBS J.*, **277**, 3470–3488.
20. Simone, R., Fratta, P., Neidle, S., Parkinson, G.N., Isaacs, A.M. (2015) G-quadruplexes: Emerging roles in neurodegenerative diseases and the non-coding transcriptome, *FEBS Lett.*, **589**, 1653–1668.
21. Yatsunyk, L.A., Mendoza, O., Mergny, J.L. (2014) «Nano-oddities»: unusual nucleic acid assemblies for DNA-based nanostructures and nanodevices, *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1836–1844.
22. Largy, E., Marchand, A., Amrane, S., Gabelica, V., Mergny, J.L. (2016) Quadruplex Turncoats: Cation-Dependent Folding and Stability of Quadruplex-DNA Double Switches, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 2780–2792.
23. Rajendran, A., Endo, M., Hidaka, K., Tran, P.L., Mergny, J.L., Sugiyama, H. (2013) Controlling the stoichiometry and strand polarity of a tetramolecular G-quadruplex structure by using a DNA origami frame, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8738–8747.
24. Kogut, M., Kleist, C., Czub, J. (2016) Molecular dynamics simulations reveal the balance of forces governing the formation of a guanine tetrad – a common structural unit of G-quadruplex DNA, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3020–3030.
25. Chung, W.J., Heddi, B., Schmitt, E., Lim, K.W., Mechulam, Y., Phan, A.T. (2015) Structure of a left-handed DNA G-quadruplex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2729–2733.
26. Bugaut, A., Balasubramanian, S. (2008) A sequence-independent study of the influence of short loop lengths on the stability and topology of intramolecular DNA G-quadruplexes, *Biochemistry*, **47**, 689–697.
27. Reshetnikov, R.V., Kopylov, A.M., Golovin, A.V. (2010) Classification of g-quadruplex DNA on the basis of the quadruplex twist angle and planarity of g-quartets, *Acta Naturae*, **2**, 72–81.
28. Kim, B.G., Shek, Y.L., Chalikian, T.V. (2013) Polyelectrolyte effects in G-quadruplexes, *Biophys. Chem.*, **184**, 95–100.
29. Gaynutdinov, T.I., Neumann, R.D., Panyutin, I.G. (2008) Structural polymorphism of intramolecular quadruplex of human telomeric DNA: effect of cations, quadruplex-binding drugs and flanking sequences, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4079–4087.
30. Reshetnikov, R.V., Sponer, J., Rassokhina, O.I., Kopylov, A.M., Tsvetkov, P.O., Makarov, A.A., Golovin, A.V. (2011) Cation binding to 15-TBA quadruplex DNA is a multiple-pathway cation-dependent process, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9789–9802.
31. Saintome, C., Amrane, S., Mergny, J.L., Alberti, P. (2016) The exception that confirms the rule: a higher-order telomeric G-quadruplex structure more stable in sodium than in potassium, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 2926–2935.
32. Sket, P., Virgilio, A., Esposito, V., Galeone, A., Plavec, J. (2012) Strand directionality affects cation binding and movement within tetramolecular G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11047–11057.
33. Podbevsek, P., Sket, P., Plavec, J. (2008) Stacking and not solely topology of T₃ loops controls rigidity and ammonium ion movement within d(G₄T₃G₄)₂ G-quadruplex, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 14287–14293.
34. De Rache, A., Mergny, J.L. (2015) Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay, *Biochimie*, **115**, 194–202.
35. Kim, B.G., Evans, H.M., Dubins, D.N., Chalikian, T.V. (2015) Effects of Salt on the Stability of a G-Quadruplex from the Human c-MYC Promoter, *Biochemistry*, **54**, 3420–3430.

36. Zhang, D., Huang, T., Lukeman, P.S., Paukstelis, P.J. (2014) Crystal structure of a DNA/Ba²⁺ G-quadruplex containing a water-mediated C-tetrad, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 13422–13429.
37. Liu, W., Zhu, H., Zheng, B., Cheng, S., Fu, Y., Li, W., Lau, T.C., Liang, H. (2012) Kinetics and mechanism of G-quadruplex formation and conformational switch in a G-quadruplex of PS2.M induced by Pb²⁺, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4229–4236.
38. Martin-Hidalgo, M., Rivera, J.M. (2011) Metallo-responsive switching between hexadecameric and octameric supramolecular G-quadruplexes, *Chem. Commun. (Camb.)*, **47**, 12485–12487.
39. Gray, R.D., Chaires, J.B. (2011) Linkage of cation binding and folding in human telomeric quadruplex DNA, *Biophys. Chem.*, **159**, 205–209.
40. Sattin, G., Artese, A., Nadai, M., Costa, G., Parrotta, L., Alcaro, S., Palumbo, M., Richter, S.N. (2013) Conformation and stability of intramolecular telomeric G-quadruplexes: sequence effects in the loops, *PLoS One*, **8**, e84113.
41. Tippiana, R., Xiao, W., Myong, S. (2014) G-quadruplex conformation and dynamics are determined by loop length and sequence, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8106–8114.
42. Guedin, A., De Cian, A., Gros, J., Lacroix, L., Mergny, J.L. (2008) Sequence effects in single-base loops for quadruplexes, *Biochimie*, **90**, 686–696.
43. Do, N.Q., Lim, K.W., Teo, M.H., Heddi, B., Phan, A.T. (2011) Stacking of G-quadruplexes: NMR structure of a G-rich oligonucleotide with potential anti-HIV and anticancer activity, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9448–9457.
44. Оглоблина А.М., Банникова В.А., Христич А.Н., Орецкая Т.С., Якубовская М.Г., Долиная Н.Г. (2015) Параллельные G-квадруплексы, образованные гуанин-богатыми микросателлитными повторами, ингибируют человеческую топоизомеразу I, *Биохимия*, **80**, 1224–1239.
45. Qin, Y., Hurley, L.H. (2008) Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions, *Biochimie*, **90**, 1149–1171.
46. Kwok, C.K., Sherlock, M.E., Bevilacqua, P.C. (2013) Effect of loop sequence and loop length on the intrinsic fluorescence of G-quadruplexes, *Biochemistry*, **52**, 3019–3021.
47. Lim, K.W., Amrane, S., Bouaziz, S., Xu, W., Mu, Y., Patel, D.J., Luu, K.N., Phan, A.T. (2009) Structure of the human telomere in K⁺ solution: a stable basket-type G-quadruplex with only two G-tetrad layers, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 4301–4309.
48. Sengar, A., Heddi, B., Phan, A.T. (2014) Formation of G-quadruplexes in poly-G sequences: structure of a propeller-type parallel-stranded G-quadruplex formed by a G₅ stretch, *Biochemistry*, **53**, 7718–7723.
49. Cang, X., Sponer, J., Cheatham, T.E., 3rd. (2011) Explaining the varied glycosidic conformational, G-tract length and sequence preferences for anti-parallel G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 4499–4512.
50. Olsen, C.M., Lee, H.T., Marky, L.A. (2009) Unfolding thermodynamics of intramolecular G-quadruplexes: base sequence contributions of the loops, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 2587–2595.
51. Чен Б., Лян Ц., Тянь Я., Лиу С. (2008) G-квадруплексные структуры: возможность их использования в антираковой терапии и в качестве пробы для детекции калия, *Биохимия*, **73**, 1061–1070.
52. Dailey, M.M., Miller, M.C., Bates, P.J., Lane, A.N., Trent, J.O. (2010) Resolution and characterization of the structural polymorphism of a

- single quadruplex-forming sequence, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4877–4888.
53. Borbone, N., Amato, J., Oliviero, G., D'Atri, V., Gabelica, V., De Pauw, E., Piccialli, G., Mayol, L. (2011) d(CGGTGGT) forms an octameric parallel G-quadruplex via stacking of unusual G(:C):G(:C):G(:C):G(:C) octads, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7848–7857.
54. D'Atri, V., Borbone, N., Amato, J., Gabelica, V., D'Errico, S., Piccialli, G., Mayol, L., Oliviero, G. (2014) DNA-based nanostructures: The effect of the base sequence on octamer formation from d(XGGYGGT) tetramolecular G-quadruplexes, *Biochimie*, **99**, 119–128.
55. Kuryavyi, V., Cahoon, L.A., Seifert, H.S., Patel, D.J. (2012) RecA-binding p1E G4 sequence essential for pilin antigenic variation forms monomeric and 5' end-stacked dimeric parallel G-quadruplexes, *Structure*, **20**, 2090–2102.
56. Adrian, M., Ang, D.J., Lech, C.J., Heddi, B., Nicolas, A., Phan, A.T. (2014) Structure and conformational dynamics of a stacked dimeric G-quadruplex formed by the human CEB1 minisatellite, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 6297–6305.
57. Phan, A.T. (2010) Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences, *FEBS J.*, **277**, 1107–1117.
58. Phan, A.T., Do, N.Q. (2013) Engineering of interlocked DNA G-quadruplexes as a robust scaffold, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2683–2688.
59. Todd, A.K., Neidle, S. (2011) Mapping the sequences of potential guanine quadruplex motifs, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 4917–4927.
60. Yadav, V.K., Abraham, J.K., Mani, P., Kulshrestha, R., Chowdhury, S. (2008) QuadBase: genome-wide database of G4 DNA—occurrence and conservation in human, chimpanzee, mouse and rat promoters and 146 microbes, *Nucleic Acids Res.*, **36**, D381–385.
61. Kikin, O., Zappala, Z., D'Antonio, L., Bagga, P.S. (2008) GRSDDB and GRS_UTRdb: databases of quadruplex forming G-rich sequences in pre-mRNAs and mRNAs, *Nucleic Acids Res.*, **36**, D141–148.
62. Huppert, J.L., Balasubramanian, S. (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 406–413.
63. Todd, A.K., Neidle, S. (2008) The relationship of potential G-quadruplex sequences in cis-upstream regions of the human genome to SP1-binding elements, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2700–2704.
64. Huppert, J.L. (2008) Hunting G-quadruplexes, *Biochimie*, **90**, 1140–1148.
65. Maizels, N., Gray, L.T. (2013) The G4 genome, *PLoS Genet.*, **9**, e1003468.
66. Neidle, S. (2010) Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer, *FEBS J.*, **277**, 1118–1125.
67. Amrane, S., Adrian, M., Heddi, B., Serero, A., Nicolas, A., Mergny, J.L., Phan, A.T. (2012) Formation of pearl-necklace monomorphic G-quadruplexes in the human CEB25 minisatellite, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5807–5816.
68. Sawaya, S., Bagshaw, A., Buschiazzo, E., Kumar, P., Chowdhury, S., Black, M.A., Gemmell, N. (2013) Microsatellite tandem repeats are abundant in human promoters and are associated with regulatory elements, *PLoS One*, **8**, e54710.
69. Lexa, M., Kejnovsky, E., Steflava, P., Konvalinova, H., Vorlickova, M., Vyskot, B. (2014) Quadruplex-forming sequences occupy discrete regions inside plant LTR retrotransposons, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 968–978.

70. Brooks, T.A., Kendrick, S., Hurley, L. (2010) Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters, *FEBS J.*, **277**, 3459–3469.
71. Du, Z., Zhao, Y., Li, N. (2008) Genome-wide analysis reveals regulatory role of G4 DNA in gene transcription, *Genome Res.*, **18**, 233–241.
72. Besnard, E., Babled, A., Lapasset, L., Milhavet, O., Parrinello, 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.
73. Cayrou, C., Coulombe, P., Puy, A., Rialle, S., Kaplan, N., Segal, E., Mechali, M. (2012) New insights into replication origin characteristics in metazoans, *Cell Cycle*, **11**, 658–667.
74. Katapadi, V.K., Nambiar, M., Raghavan, S.C. (2012) Potential G-quadruplex formation at breakpoint regions of chromosomal translocations in cancer may explain their fragility, *Genomics*, **100**, 72–80.
75. Mani, P., Yadav, V.K., Das, S.K., Chowdhury, S. (2009) Genome-wide analyses of recombination prone regions predict role of DNA structural motif in recombination, *PLoS One*, **4**, e4399.
76. Kuryavyi, V., Patel, D.J. (2010) Solution structure of a unique G-quadruplex scaffold adopted by a guanosine-rich human intronic sequence, *Structure*, **18**, 73–82.
77. Zizza, P., Cingolani, C., Artuso, S., Salvati, E., Rizzo, A., D'Angelo, C., Porru, M., Pagano, B., Amato, J., Randazzo, A., Novellino, E., Stopacciaro, A., Gilson, E., Stassi, G., Leonetti, C., Biroccio, A. (2016) Intragenic G-quadruplex structure formed in the human CD133 and its biological and translational relevance, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1579–1590.
78. Du, Z., Zhao, Y., Li, N. (2009) Genome-wide colonization of gene regulatory elements by G4 DNA motifs, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6784–6798.
79. 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) Association of G-quadruplex forming sequences with human mtDNA deletion breakpoints, *BMC Genomics*, **15**, 677.
80. Huppert, J.L. (2010) Structure, location and interactions of G-quadruplexes, *FEBS J.*, **277**, 3452–3458.
81. Martadinata, H., Phan, A.T. (2013) Structure of human telomeric RNA (TERRA): stacking of two G-quadruplex blocks in K^+ solution, *Biochemistry*, **52**, 2176–2183.
82. Mirihana Arachchilage, G., Dassanayake, A.C., Basu, S. (2015) A potassium ion-dependent RNA structural switch regulates human pre-miRNA 92b maturation, *Chem. Biol.*, **22**, 262–272.
83. Jayaraj, G.G., Pandey, S., Scaria, V., Maiti, S. (2012) Potential G-quadruplexes in the human long non-coding transcriptome, *RNA Biol.*, **9**, 81–86.
84. Frees, S., Menendez, C., Crum, M., Bagga, P.S. (2014) QGRS-Conserved: a computational method for discovering evolutionarily conserved G-quadruplex motifs, *Hum. Genomics*, **8**, 8.
85. Зыбайлов Б.Л., Шерпа М.Д., Глазко Г.В., Раней К.Д., Глазко В.И. (2013) G4-квадруплексы и геномная нестабильность, *Молекулярная биология*, **47**, 224–231.
86. Zhang, C., Liu, H.H., Zheng, K.W., Hao, Y.H., Tan, Z. (2013) DNA G-quadruplex formation in response to remote downstream transcription activity: long-range sensing and signal transducing in DNA double helix, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7144–7152.
87. Agrawal, P., Lin, C., Mathad, R.I., Carver, M., Yang, D. (2014) The

- major G-quadruplex formed in the human BCL-2 proximal promoter adopts a parallel structure with a 13-nt loop in K⁺ solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 1750–1753.
88. Davis, L., Maizels, N. (2011) G4 DNA: at risk in the genome, *EMBO J.*, **30**, 3878–3879.
89. Eddy, J., Vallur, A.C., Varma, S., Liu, H., Reinhold, W.C., Pommier, Y., Maizels, N. (2011) G4 motifs correlate with promoter-proximal transcriptional pausing in human genes, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 4975–4983.
90. Capra, J.A., Paeschke, K., Singh, M., Zakian, V.A. (2010) G-quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000861.
91. Kwok, C.K., Ding, Y., Shahid, S., Assmann, S.M., Bevilacqua, P.C. (2015) A stable RNA G-quadruplex within the 5'-UTR of *Arabidopsis thaliana* ATR mRNA inhibits translation, *Biochem J.*, **467**, 91–102.
92. 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.
93. Guedin, A., Gros, J., Alberti, P., Mergny, J.L. (2010) How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7858–7868.
94. Mukundan, V.T., Phan, A.T. (2013) Bulges in G-quadruplexes: broadening the definition of G-quadruplex-forming sequences, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 5017–5028.
95. Beaudoin, J.D., Jodoin, R., Perreault, J.P. (2014) New scoring system to identify RNA G-quadruplex folding, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1209–1223.
96. Pandey, S., Agarwala, P., Maiti, S. (2013) Effect of loops and G-quartets on the stability of RNA G-quadruplexes, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 6896–6905.
97. Bedrat, A., Lacroix, L., Mergny, J.L. (2016) Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1746–1759.
98. Du, X., Wojtowicz, D., Bowers, A.A., Levens, D., Benham, C.J., Przytycka, T.M. (2013) The genome-wide distribution of non-B DNA motifs is shaped by operon structure and suggests the transcriptional importance of non-B DNA structures in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5965–5977.
99. Amrane, S., Kerkour, A., Bedrat, A., Vialet, B., Andreola, M.L., Mergny, J.L. (2014) Topology of a DNA G-quadruplex structure formed in the HIV-1 promoter: a potential target for anti-HIV drug development, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 5249–5252.
100. Piekna-Przybylska, D., Sullivan, M.A., Sharma, G., Bambara, R.A. (2014) U3 region in the HIV-1 genome adopts a G-quadruplex structure in its RNA and DNA sequence, *Biochemistry*, **53**, 2581–2593.
101. Perrone, R., Nadai, M., Frasson, I., Poe, J.A., Butovskaya, E., Smithgall, T.E., Palumbo, M., Palu, G., Richter, S.N. (2013) A dynamic G-quadruplex region regulates the HIV-1 long terminal repeat promoter, *J. Med. Chem.*, **56**, 6521–6530.
102. Norseen, J., Johnson, F.B., Lieberman, P.M. (2009) Role for G-quadruplex RNA binding by Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in DNA replication and metaphase chromosome attachment, *J. Virol.*, **83**, 10336–10346.
103. Murat, P., Zhong, J., Lekieffre, L., Cowieson, N.P., Clancy, J.L., Preiss, T., Balasubramanian, S., Khan-

- na, R., Tellam, J. (2014) G-quadruplexes regulate Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 mRNA translation, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 358–364.
104. Tluckova, K., Marusic, M., Tothova, P., Bauer, L., Sket, P., Plavec, J., Vighlasky, V. (2013) Human papillomavirus G-quadruplexes, *Biochemistry*, **52**, 7207–7216.
105. Musumeci, D., Riccardi, C., Montesarchio, D. (2015) G-Quadruplex Forming Oligonucleotides as Anti-HIV Agents, *Molecules*, **20**, 17511–17532.
106. Vorlickova, M., Kejnovska, I., Sagi, J., Renciuik, D., Bednarova, K., Motlova, J., Kypr, J. (2012) Circular dichroism and guanine quadruplexes, *Methods*, **57**, 64–75.
107. Olsen, C.M., Marky, L.A. (2010) Monitoring the temperature unfolding of G-quadruplexes by UV and circular dichroism spectroscopies and calorimetry techniques, *Methods Mol. Biol.*, **608**, 147–158.
108. Karsisiotis, A.I., Hessari, N.M., Novellino, E., Spada, G.P., Randazzo, A., Webba da Silva, M. (2011) Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**, 10645–10648.
109. Tran, P.L., Mergny, J.L., Alberti, P. (2011) Stability of telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3282–3294.
110. Shek, Y.L., Noudeh, G.D., Nazari, M., Heerklotz, H., Abu-Ghazalah, R.M., Dubins, D.N., Chalikian, T.V. (2014) Folding thermodynamics of the hybrid-I type intramolecular human telomeric G-quadruplex, *Biopolymers*, **101**, 216–227.
111. Petraccone, L., Spink, C., Trent, J.O., Garbett, N.C., Mekmaysy, C.S., Giancola, C., Chaires, J.B. (2011) Structure and stability of higher-order human telomeric quadruplexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 20951–20961.
112. Russo Krauss, I., Pica, A., Merlino, A., Mazzarella, L., Sica, F. (2013) Duplex-quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 2403–2411.
113. Sun, D., Hurley, L.H. (2009) The importance of negative superhelicity in inducing the formation of G-quadruplex and i-motif structures in the c-Myc promoter: implications for drug targeting and control of gene expression, *J. Med. Chem.*, **52**, 2863–2874.
114. Sun, D., Guo, K., Shin, Y.J. (2011) Evidence of the formation of G-quadruplex structures in the promoter region of the human vascular endothelial growth factor gene, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1256–1265.
115. Mendoza, O., Gueddouda, N.M., Boule, J.B., Bourdoncle, A., Mergny, J.L. (2015) A fluorescence-based helicase assay: application to the screening of G-quadruplex ligands, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e71.
116. Kreig, A., Calvert, J., Sanoica, J., Cullum, E., Tipanna, R., Myong, S. (2015) G-quadruplex formation in double strand DNA probed by NMM and CV fluorescence, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 7961–7970.
117. Long, X., Parks, J.W., Bagshaw, C.R., Stone, M.D. (2013) Mechanical unfolding of human telomere G-quadruplex DNA probed by integrated fluorescence and magnetic tweezers spectroscopy, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2746–2755.
118. Ray, S., Bandaria, J.N., Qureshi, M.H., Yildiz, A., Balci, H. (2014) G-quadruplex formation in telomeres enhances POT1/TPP1 protection against RPA binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2990–2995.

119. Palacky, J., Vorlickova, M., Kejnovska, I., Mojzes, P. (2013) Polymorphism of human telomeric quadruplex structure controlled by DNA concentration: a Raman study, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1005–1016.
120. Zhang, X., Xu, C.X., Di Felice, R., Sponer, J., Islam, B., Stadlbauer, P., Ding, Y., Mao, L., Mao, Z.W., Qin, P.Z. (2016) Conformations of Human Telomeric G-Quadruplex Studied Using a Nucleotide-Independent Nitroxide Label, *Biochemistry*, **55**, 360–372.
121. Singh, V., Azarkh, M., Drescher, M., Hartig, J.S. (2012) Conformations of individual quadruplex units studied in the context of extended human telomeric DNA, *Chem. Commun. (Camb.)*, **48**, 8258–8260.
122. Haider, S., Neidle, S. (2010) Molecular modeling and simulation of G-quadruplexes and quadruplex-ligand complexes, *Methods Mol. Biol.*, **608**, 17–37.
123. Husby, J., Todd, A.K., Platts, J.A., Neidle, S. (2013) Small-molecule G-quadruplex interactions: Systematic exploration of conformational space using multiple molecular dynamics, *Biopolymers*, **99**, 989–1005.
124. Islam, B., Stadlbauer, P., Neidle, S., Haider, S., Sponer, J. (2016) Can We Execute Reliable MM-PBSA Free Energy Computations of Relative Stabilities of Different Guanine Quadruplex Folds?, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 2899–2912.
125. Collie, G.W., Parkinson, G.N., Neidle, S., Rosu, F., De Pauw, E., Gabelica, V. (2010) Electrospray mass spectrometry of telomeric RNA (TERRA) reveals the formation of stable multimeric G-quadruplex structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9328–9334.
126. Adrian, M., Heddi, B., Phan, A.T. (2012) NMR spectroscopy of G-quadruplexes, *Methods*, **57**, 11–24.
127. Lim, K.W., Ng, V.C., Martin-Pintado, N., Heddi, B., Phan, A.T. (2013) Structure of the human telomere in Na⁺ solution: an antiparallel (2+2) G-quadruplex scaffold reveals additional diversity, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10556–10562.
128. Lane, A.N., Chaires, J.B., Gray, R.D., Treent, J.O. (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5482–5515.
129. Chaires, J.B. (2010) Human telomeric G-quadruplex: thermodynamic and kinetic studies of telomeric quadruplex stability, *FEBS J.*, **277**, 1098–1106.
130. Stegle, O., Payet, L., Mergny, J.L., MacKay, D.J., Leon, J.H. (2009) Predicting and understanding the stability of G-quadruplexes, *Bioinformatics*, **25**, i374–382.
131. Lane, A.N. (2012) The stability of intramolecular DNA G-quadruplexes compared with other macromolecules, *Biochimie*, **94**, 277–286.
132. Kankia, B.I. (2011) Self-dissociative primers for nucleic acid amplification and detection based on DNA quadruplexes with intrinsic fluorescence, *Anal. Biochem.*, **409**, 59–65.
133. Heddi, B., Martin-Pintado, N., Serimbetov, Z., Kari, T.M., Phan, A.T. (2016) G-quadruplexes with (4n - 1) guanines in the G-tetrad core: formation of a G-triad•water complex and implication for small-molecule binding, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 910–916.
134. Cerofolini, L., Amato, J., Giachetti, A., Limongelli, V., Novellino, E., Parrinello, M., Fragai, M., Randazzo, A., Luchinat, C. (2014) G-triplex structure and formation propensity, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 13393–13404.
135. Virgilio, A., Petraccone, L., Esposito, V., Citarella, G., Giancola, C., Galeone, A. (2012) The abasic

- site lesions in the human telomeric sequence d[TA(G₃T₂A)₃G₃]: a thermodynamic point of view, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 2037–2043.
136. Harkness, R.W.t., Mittermaier, A.K. (2016) G-register exchange dynamics in guanine quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3481–3494.
137. Mathias, J., Okyere, R., Lomidze, L., Gvarjaladze, D., Musier-Forsyth, K., Kankia, B. (2014) Thermal stability of quadruplex primers for highly versatile isothermal DNA amplification, *Biophys. Chem.*, **185**, 14–18.
138. Hatzakis, E., Okamoto, K., Yang, D. (2010) Thermodynamic stability and folding kinetics of the major G-quadruplex and its loop isomers formed in the nuclease hypersensitive element in the human c-Myc promoter: effect of loops and flanking segments on the stability of parallel-stranded intramolecular G-quadruplexes, *Biochemistry*, **49**, 9152–9160.
139. Piazza, A., Adrian, M., Samazan, F., Heddi, B., Hamon, F., Serero, A., Lopes, J., Teulade-Fichou, M.P., Phan, A.T., Nicolas, A. (2015) Short loop length and high thermal stability determine genomic instability induced by G-quadruplex-forming minisatellites, *EMBO J.*, **34**, 1718–1734.
140. Mathad, R.I., Hatzakis, E., Dai, J., Yang, D. (2011) c-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5'-end of NHE III1 element: insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9023–9033.
141. Selvam, S., Yu, Z.B., Mao, H.B. (2016) Exploded view of higher order G-quadruplex structures through click-chemistry assisted single-molecule mechanical unfolding, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 45–55.
142. Kuryavyi, V., Phan, A.T., Patel, D.J. (2010) Solution structures of all parallel-stranded monomeric and dimeric G-quadruplex scaffolds of the human *c-kit2* promoter, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6757–6773.
143. Zhou, J., Tateishi-Karimata, H., Mergny, J.L., Cheng, M., Feng, Z., Miyoshi, D., Sugimoto, N., Li, C. (2016) Reevaluation of the stability of G-quadruplex structures under crowding conditions, *Biochimie*, **121**, 204–208.
144. Nagatoishi, S., Isono, N., Tsumoto, K., Sugimoto, N. (2011) Hydration is required in DNA G-quadruplex-protein binding, *Chembiochem*, **12**, 1822–1826.
145. Miyoshi, D., Fujimoto, T., Sugimoto, N. (2013) Molecular crowding and hydration regulating of G-quadruplex formation, *Top. Curr. Chem.*, **330**, 87–110.
146. You, H., Zeng, X., Xu, Y., Lim, C.J., Efremov, A.K., Phan, A.T., Yan, J. (2014) Dynamics and stability of polymorphic human telomeric G-quadruplex under tension, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8789–8795.
147. Gray, R.D., Li, J., Chaires, J.B. (2009) Energetics and kinetics of a conformational switch in G-quadruplex DNA, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 2676–2683.
148. Buscaglia, R., Gray, R.D., Chaires, J.B. (2013) Thermodynamic characterization of human telomere quadruplex unfolding, *Biopolymers*, **99**, 1006–1018.
149. Boncina, M., Lah, J., Prislan, I., Vesnaver, G. (2012) Energetic basis of human telomeric DNA folding into G-quadruplex structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9657–9663.
150. Gray, R.D., Trent, J.O., Chaires, J.B. (2014) Folding and unfolding pathways of the human telomeric G-quadruplex, *J. Mol. Biol.*, **426**, 1629–1650.
151. David Wilson, W., Paul, A. (2014) Kinetics and structures on the molecular path to the quadruplex form of

- the human telomere, *J. Mol. Biol.*, **426**, 1625–1628.
152. Li, W., Hou, X.M., Wang, P.Y., Xi, X.G., Li, M. (2013) Direct measurement of sequential folding pathway and energy landscape of human telomeric G-quadruplex structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 6423–6426.
153. Koirala, D., Ghimire, C., Bohrer, C., Sannohe, Y., Sugiyama, H., Mao, H. (2013) Long-loop G-quadruplexes are misfolded population minorities with fast transition kinetics in human telomeric sequences, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 2235–2241.
154. Stadlbauer, P., Trantirek, L., Cheatham, T.E., 3rd, Koca, J., Sponer, J. (2014) Triplex intermediates in folding of human telomeric quadruplexes probed by microsecond-scale molecular dynamics simulations, *Biochimie*, **105**, 22–35.
155. Gray, R.D., Chaires, J.B. (2008) Kinetics and mechanism of K⁺- and Na⁺-induced folding of models of human telomeric DNA into G-quadruplex structures, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4191–4203.
156. Zhang, A.Y., Balasubramanian, S. (2012) The kinetics and folding pathways of intramolecular G-quadruplex nucleic acids, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 19297–19308.
157. You, H., Wu, J., Shao, F., Yan, J. (2015) Stability and kinetics of *c-MYC* promoter G-quadruplexes studied by single-molecule manipulation, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 2424–2427.
158. Stadlbauer, P., Kuhrova, P., Banas, P., Koca, J., Bussi, G., Trantirek, L., Otyepka, M., Sponer, J. (2015) Hairpins participating in folding of human telomeric sequence quadruplexes studied by standard and T-REMD simulations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 9626–9644.
159. Bessi, I., Jonker, H.R., Richter, C., Schwalbe, H. (2015) Involvement of Long-Lived Intermediate States in the Complex Folding Pathway of the Human Telomeric G-Quadruplex, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**, 8444–8448.
160. Prislán, I., Lah, J., Milanic, M., Vesnaver, G. (2011) Kinetically governed polymorphism of d(G₄T₄G₃) quadruplexes in K⁺ solutions, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1933–1942.
161. Yu, Z., Gaerig, V., Cui, Y., Kang, H., Gokhale, V., Zhao, Y., Hurley, L.H., Mao, H. (2012) Tertiary DNA structure in the single-stranded hTERT promoter fragment unfolds and refolds by parallel pathways via cooperative or sequential events, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5157–5164.
162. Abraham Punnoose, J., Cui, Y., Koirala, D., Yangyuoru, P.M., Ghimire, C., Shrestha, P., Mao, H. (2014) Interaction of G-quadruplexes in the full-length 3' human telomeric overhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 18062–18069.
163. Dhakal, S., Yu, Z., Konik, R., Cui, Y., Koirala, D., Mao, H. (2012) G-quadruplex and i-motif are mutually exclusive in ILPR double-stranded DNA, *Biophys. J.*, **102**, 2575–2584.
164. Dhakal, S., Cui, Y., Koirala, D., Ghimire, C., Kushwaha, S., Yu, Z., Yangyuoru, P.M., Mao, H. (2013) Structural and mechanical properties of individual human telomeric G-quadruplexes in molecularly crowded solutions, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3915–3923.
165. Bergues-Pupo, A.E., Arias-Gonzalez, J.R., Moron, M.C., Fiasconaro, A., Falo, F. (2015) Role of the central cations in the mechanical unfolding of DNA and RNA G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 7638–7647.
166. de Messieres, M., Chang, J.C., Brawn-Cinani, B., La Porta, A. (2012) Single-molecule study of G-quadruplex disruption using dynamic force spectroscopy, *Phys Rev Lett*, **109**, 058101.

167. Ghimire, C., Park, S., Iida, K., Yangyuoru, P., Otomo, H., Yu, Z., Nagasawa, K., Sugiyama, H., Mao, H. (2014) Direct quantification of loop interaction and pi-pi stacking for G-quadruplex stability at the submolecular level, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 15537–15544.
168. Long, X., Stone, M.D. (2013) Kinetic partitioning modulates human telomere DNA G-quadruplex structural polymorphism, *PLoS One*, **8**, e83420.
169. Arora, A., Nair, D.R., Maiti, S. (2009) Effect of flanking bases on quadruplex stability and Watson-Crick duplex competition, *FEBS J.*, **276**, 3628–3640.
170. Mendoza, O., Elezgaray, J., Mergny, J.L. (2015) Kinetics of quadruplex to duplex conversion, *Biochimie*, **118**, 225–233.
171. Kuo, M.H., Wang, Z.F., Tseng, T.Y., Li, M.H., Hsu, S.T., Lin, J.J., Chang, T.C. (2015) Conformational transition of a hairpin structure to G-quadruplex within the *WNT1* gene promoter, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 210–218.
172. Gupta, A., Lee, L.L., Roy, S., Taniou, F.A., Wilson, W.D., Ly, D.H., Armitage, B.A. (2013) Strand invasion of DNA quadruplexes by PNA: comparison of homologous and complementary hybridization, *ChemBiochem*, **14**, 1476–1484.
173. Lv, B., Li, D., Zhang, H., Lee, J.Y., Li, T. (2013) DNA gyrase-driven generation of a G-quadruplex from plasmid DNA, *Chem. Commun. (Camb.)*, **49**, 8317–8319.
174. Zhabinskaya, D., Benham, C.J. (2012) Theoretical analysis of competing conformational transitions in superhelical DNA, *PLoS Comput. Biol.*, **8**, e1002484.
175. Selvam, S., Koirala, D., Yu, Z., Mao, H. (2014) Quantification of topological coupling between DNA superhelicity and G-quadruplex formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 13967–13970.
176. Brazier, J.A., Shah, A., Brown, G.D. (2012) I-motif formation in gene promoters: unusually stable formation in sequences complementary to known G-quadruplexes, *Chem. Commun. (Camb.)*, **48**, 10739–10741.
177. Kendrick, S., Kang, H.J., Alam, M.P., Madathil, M.M., Agrawal, P., Gokhale, V., Yang, D., Hecht, S.M., Hurley, L.H. (2014) The dynamic character of the *BCL2* promoter i-motif provides a mechanism for modulation of gene expression by compounds that bind selectively to the alternative DNA hairpin structure, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 4161–4171.
178. Bhavsar-Jog, Y.P., Van Dornshuld, E., Brooks, T.A., Tschumper, G.S., Wadkins, R.M. (2014) Epigenetic modification, dehydration, and molecular crowding effects on the thermodynamics of i-motif structure formation from C-rich DNA, *Biochemistry*, **53**, 1586–1594.
179. Reilly, S.M., Morgan, R.K., Brooks, T.A., Wadkins, R.M. (2015) Effect of interior loop length on the thermal stability and pK_a of i-motif DNA, *Biochemistry*, **54**, 1364–1370.
180. König, S.L., Huppert, J.L., Sigel, R.K., Evans, A.C. (2013) Distance-dependent duplex DNA destabilization proximal to G-quadruplex/i-motif sequences, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7453–7461.
181. Rajendran, A., Nakano, S., Sugimoto, N. (2010) Molecular crowding of the cosolutes induces an intramolecular i-motif structure of triplet repeat DNA oligomers at neutral pH, *Chem. Commun. (Camb.)*, **46**, 1299–1301.
182. Cui, J., Waltman, P., Le, V.H., Lewis, E.A. (2013) The effect of molecular crowding on the stability of human c-MYC promoter sequence I-motif at neutral pH, *Molecules*, **18**, 12751–12767.

183. Cui, Y., Kong, D., Ghimire, C., Xu, C., Mao, H. (2016) Mutually Exclusive Formation of G-Quadruplex and i-Motif Is a General Phenomenon Governed by Steric Hindrance in Duplex DNA, *Biochemistry*, **55**, 2291–2299.
184. Kang, H.J., Kendrick, S., Hecht, S.M., Hurley, L.H. (2014) The transcriptional complex between the *BCL2* i-motif and hnRNP LL is a molecular switch for control of gene expression that can be modulated by small molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 4172–4185.
185. Lim, K.W., Phan, A.T. (2013) Structural basis of DNA quadruplex-duplex junction formation, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 8566–8569.
186. Lim, K.W., Khong, Z.J., Phan, A.T. (2014) Thermal stability of DNA quadruplex-duplex hybrids, *Biochemistry*, **53**, 247–257.
187. Lim, K.W., Nguyen, T.Q., Phan, A.T. (2014) Joining of multiple duplex stems at a single quadruplex loop, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 17969–17973.
188. Lim, K.W., Jenjaroenpun, P., Low, Z.J., Khong, Z.J., Ng, Y.S., Kuznetsov, V.A., Phan, A.T. (2015) Duplex stem-loop-containing quadruplex motifs in the human genome: a combined genomic and structural study, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5630–5646.
189. Spiridonova, V.A., Barinova, K.V., Glinkina, K.A., Melnichuk, A.V., Gainutdinov, A.A., Safenkova, I.V., Dzantiev, B.B. (2015) A family of DNA aptamers with varied duplex region length that forms complexes with thrombin and prothrombin, *FEBS Lett.*, **589**, 2043–2049.
190. Dolinnaya, N.G., Yuminova, A.V., Spiridonova, V.A., Arutyunyan, A.M., Kopylov, A.M. (2012) Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **30**, 524–531.
191. Yu, H., Gu, X., Nakano, S., Miyoshi, D., Sugimoto, N. (2012) Beads-on-a-string structure of long telomeric DNAs under molecular crowding conditions, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20060–20069.
192. Martadinata, H., Heddi, B., Lim, K.W., Phan, A.T. (2011) Structure of long human telomeric RNA (TERRA): G-quadruplexes formed by four and eight UUAGGG repeats are stable building blocks, *Biochemistry*, **50**, 6455–6461.
193. Bauer, L., Tluczkova, K., Tohova, P., Viglasky, V. (2011) G-quadruplex motifs arranged in tandem occurring in telomeric repeats and the insulin-linked polymorphic region, *Biochemistry*, **50**, 7484–7492.
194. Hansel, R., Lohr, F., Trantirek, L., Dotsch, V. (2013) High-resolution insight into G-overhang architecture, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 2816–2824.
195. Selvam, S., Yu, Z., Mao, H. (2016) Exploded view of higher order G-quadruplex structures through click-chemistry assisted single-molecule mechanical unfolding, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 45–55.
196. Kankia, B., Gvarjaladze, D., Rabe, A., Lomidze, L., Metreveli, N., Musier-Forsyth, K. (2016) Stable Domain Assembly of a Monomolecular DNA Quadruplex: Implications for DNA-Based Nanoswitches, *Biophys. J.*, **110**, 2169–2175.
197. Wang, H., Nora, G.J., Ghodke, H., Opresko, P.L. (2011) Single molecule studies of physiologically relevant telomeric tails reveal POT1 mechanism for promoting G-quadruplex unfolding, *J. Biol. Chem.*, **286**, 7479–7489.
198. Rajendran, A., Endo, M., Hidaka, K., Sugiyama, H. (2014) Direct and single-molecule visualization of the solution-state structures of

- G-hairpin and G-triplex intermediates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 4107–4112.
199. Payet, L., Huppert, J.L. (2012) Stability and structure of long intramolecular G-quadruplexes, *Biochemistry*, **51**, 3154–3161.
200. Chen, Y., Agrawal, P., Brown, R.V., Hatzakis, E., Hurley, L., Yang, D. (2012) The major G-quadruplex formed in the human platelet-derived growth factor receptor beta promoter adopts a novel broken-strand structure in K⁺ solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13220–13223.
201. Bugaut, A., Alberti, P. (2015) Understanding the stability of DNA G-quadruplex units in long human telomeric strands, *Biochimie*, **113**, 125–133.
202. Vy Thi Le, T., Han, S., Chae, J., Park, H.J. (2012) G-quadruplex binding ligands: from naturally occurring to rationally designed molecules, *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 1948–1972.
203. Rodriguez, R., Miller, K.M., Forment, J.V., Bradshaw, C.R., Nikan, M., Britton, S., Oelschlaegel, T., Xhemalce, B., Balasubramanian, S., Jackson, S.P. (2012) Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 301–310.
204. Rizzo, A., Salvati, E., Biroccio, A. (2012) Methods of studying telomere damage induced by quadruplex-ligand complexes, *Methods*, **57**, 93–99.
205. Muller, S., Kumari, S., Rodriguez, R., Balasubramanian, S. (2010) Small-molecule-mediated G-quadruplex isolation from human cells, *Nat. Chem.*, **2**, 1095–1098.
206. Kwok, C.K., Balasubramanian, S. (2015) Targeted Detection of G-Quadruplexes in Cellular RNAs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**, 6751–6754.
207. Largy, E., Granzhan, A., Hamon, F., Verga, D., Teulade-Fichou, M.P. (2013) Visualizing the quadruplex: from fluorescent ligands to light-up probes, *Top. Curr. Chem.*, **330**, 111–177.
208. Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.P. (2008) A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands, *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 627–636.
209. Di Leva, F.S., Novellino, E., Cavalli, A., Parrinello, M., Limongelli, V. (2014) Mechanistic insight into ligand binding to G-quadruplex DNA, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5447–5455.
210. Ou, T.M., Lu, Y.J., Tan, J.H., Huang, Z.S., Wong, K.Y., Gu, L.Q. (2008) G-quadruplexes: targets in anticancer drug design, *ChemMedChem*, **3**, 690–713.
211. Ильинский Н.С., Варижук А.М., Бениаминов А.Д., Пузанов М.А., Щелкина А.К., Калюжный Д.Н. (2014) G-квадруплексные лиганды: механизмы противоопухолевого действия и связывания с мишенью, *Молекулярная биология*, **48**, 891–907.
212. Douarre, C., Mergui, X., Sidibe, A., Gomez, D., Alberti, P., Mailliet, P., Trentesaux, C., Riou, J.F. (2013) DNA damage signaling induced by the G-quadruplex ligand 12459 is modulated by PPM1D/WIP1 phosphatase, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3588–3599.
213. Piazza, A., Boule, J.B., Lopes, J., Mingo, K., Largy, E., Teulade-Fichou, M.P., Nicolas, A. (2010) Genetic instability triggered by G-quadruplex interacting Phen-DC compounds in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4337–4348.
214. Chung, W.J., Heddi, B., Tera, M., Iida, K., Nagasawa, K., Phan, A.T. (2013) Solution structure of an intramolecular (3 + 1) human telomeric G-quadruplex bound to

- a telomestatin derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 13495–13501.
215. Bazzicalupi, C., Ferraroni, M., Bilia, A.R., Scheggi, F., Gratteri, P. (2013) The crystal structure of human telomeric DNA complexed with berberine: an interesting case of stacked ligand to G-tetrad ratio higher than 1:1, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 632–638.
216. Clark, G.R., Pytel, P.D., Squire, C.J. (2012) The high-resolution crystal structure of a parallel intermolecular DNA G-4 quadruplex/drug complex employing syn glycosyl linkages, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5731–5738.
217. Lavrado, J., Borralho, P.M., Ohnmacht, S.A., Castro, R.E., Rodrigues, C.M., Moreira, R., dos Santos, D.J., Neidle, S., Paulo, A. (2013) Synthesis, G-quadruplex stabilisation, docking studies, and effect on cancer cells of indolo[3,2-b]quinolines with one, two, or three basic side chains, *ChemMedChem*, **8**, 1648–1661.
218. Koirala, D., Dhakal, S., Ashbridge, B., Sannohe, Y., Rodriguez, R., Sugiyama, H., Balasubramanian, S., Mao, H. (2011) A single-molecule platform for investigation of interactions between G-quadruplexes and small-molecule ligands, *Nat. Chem.*, **3**, 782–787.
219. Jain, A.K., Bhattacharya, S. (2011) Interaction of G-quadruplexes with nonintercalating duplex-DNA minor groove binding ligands, *Bioconjug. Chem.*, **22**, 2355–2368.
220. Hamon, F., Largy, E., Guedin-Beu-repaire, A., Rouchon-Dagois, M., Sidibe, A., Monchaud, D., Mergny, J.L., Riou, J.F., Nguyen, C.H., Teulade-Fichou, M.P. (2011) An acyclic oligoheteroaryle that discriminates strongly between diverse G-quadruplex topologies, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**, 8745–8749.
221. Sabharwal, N.C., Savikhin, V., Turek-Herman, J.R., Nicoludis, J.M., Szalai, V.A., Yatsunyk, L.A. (2014) N-methylmesoporphyrin IX fluorescence as a reporter of strand orientation in guanine quadruplexes, *FEBS J.*, **281**, 1726–1737.
222. Dhamodharan, V., Harikrishna, S., Bhasikuttan, A.C., Pradeepkumar, P.I. (2015) Topology specific stabilization of promoter over telomeric G-quadruplex DNAs by bisbenzimidazole carboxamide derivatives, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 821–833.
223. Wang, J., Chen, Y., Ren, J., Zhao, C., Qu, X. (2014) G-Quadruplex binding enantiomers show chiral selective interactions with human telomere, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3792–3802.
224. Yu, Q., Liu, Y., Wang, C., Sun, D., Yang, X., Liu, Y., Liu, J. (2012) Chiral ruthenium(II) polypyridyl complexes: stabilization of g-quadruplex DNA, inhibition of telomerase activity and cellular uptake, *PLoS One*, **7**, e50902.
225. Zhao, A., Zhao, C., Ren, J., Qu, X. (2015) Enantioselective targeting left-handed Z-G-quadruplex, *Chem. Commun. (Camb.)*.
226. Boncina, M., Podlipnik, C., Piantanida, I., Eilmes, J., Teulade-Fichou, M.P., Vesnaver, G., Lah, J. (2015) Thermodynamic fingerprints of ligand binding to human telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10376–10386.
227. Waller, Z.A., Howell, L.A., Macdonald, C.J., O'Connell, M.A., Searcey, M. (2014) Identification and characterisation of a G-quadruplex forming sequence in the promoter region of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **447**, 128–132.
228. Wang, Z.F., Li, M.H., Chen, W.W., Hsu, S.T., Chang, T.C. (2016) A novel transition pathway of ligand-induced topological conversion from hybrid forms to parallel forms

- of human telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3958–3968.
229. McLuckie, K.I., Waller, Z.A., Sanders, D.A., Alves, D., Rodriguez, R., Dash, J., McKenzie, G.J., Venkitaraman, A.R., Balasubramanian, S. (2011) G-quadruplex-binding benzo[a]phenoxazines down-regulate *c-KIT* expression in human gastric carcinoma cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2658–2663.
230. Alzeer, J., Luedtke, N.W. (2010) pH-mediated fluorescence and G-quadruplex binding of amido phthalocyanines, *Biochemistry*, **49**, 4339–4348.
231. Lin, S., He, B., Yang, C., Leung, C.H., Mergny, J.L., Ma, D.L. (2015) Luminescence switch-on assay of interferon-gamma using a G-quadruplex-selective iridium(III) complex, *Chem. Commun. (Camb.)*, **51**, 16033–16036.
232. Guo, Y., Zhou, L., Xu, L., Zhou, X., Hu, J., Pei, R. (2014) Multiple types of logic gates based on a single G-quadruplex DNA strand, *Sci. Rep.*, **4**, 7315.
233. Gabelica, V., Maeda, R., Fujimoto, T., Yaku, H., Murashima, T., Sugimoto, N., Miyoshi, D. (2013) Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe thioflavin T with human telomere DNA G-quadruplex, *Biochemistry*, **52**, 5620–5628.
234. Doria, F., Nadai, M., Folini, M., Di Antonio, M., Germani, L., Percivalle, C., Sissi, C., Zaffaroni, N., Alcaro, S., Artese, A., Richter, S.N., Freccero, M. (2012) Hybrid ligand-alkylating agents targeting telomeric G-quadruplex structures, *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 2798–2806.
235. Di Antonio, M., Biffi, G., Mariani, A., Raiber, E.A., Rodriguez, R., Balasubramanian, S. (2012) Selective RNA versus DNA G-quadruplex targeting by in situ click chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 11073–11078.
236. Morris, M.J., Wingate, K.L., Silwal, J., Leeper, T.C., Basu, S. (2012) The porphyrin TmPyP4 unfolds the extremely stable G-quadruplex in MT3–MMP mRNA and alleviates its repressive effect to enhance translation in eukaryotic cells, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4137–4145.
237. Faudale, M., Cogoi, S., Xodo, L.E. (2012) Photoactivated cationic alkyl-substituted porphyrin binding to g4–RNA in the 5'-UTR of *KRAS* oncogene represses translation, *Chem. Commun. (Camb.)*, **48**, 874–876.
238. Alcaro, S., Costa, G., Distinto, S., Moraca, F., Ortuso, F., Parrotta, L., Artese, A. (2012) The polymorphisms of DNA G-quadruplex investigated by docking experiments with telomestatin enantiomers, *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 1873–1879.
239. Li, Q., Xiang, J.F., Yang, Q.F., Sun, H.X., Guan, A.J., Tang, Y.L. (2013) G4LDB: a database for discovering and studying G-quadruplex ligands, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D1115–1123.
240. Le, D.D., Di Antonio, M., Chan, L.K., Balasubramanian, S. (2015) G-quadruplex ligands exhibit differential G-tetrad selectivity, *Chem. Commun. (Camb.)*, **51**, 8048–8050.
241. Kaluzhny, D.N., Mamaeva, O.K., Beniaminov, A.D., Shchyolkina, A.K., Livshits, M.A. (2016) The Thermodynamics of Binding of Low-Molecular-Weight Ligands at Extreme Tetrads of Telomeric G-Quadruplexes, *Biophysics*, **61**, 28–33.
242. Gai, W., Yang, Q., Xiang, J., Jiang, W., Li, Q., Sun, H., Guan, A., Shang, Q., Zhang, H., Tang, Y. (2013) A dual-site simultaneous binding mode in the interaction between parallel-stranded G-quadruplex [d(TGGGGT)]₄ and cyanine dye 2,2'-diethyl-9-methyl-selenocarbocyanine bromide, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2709–2722.

243. Li, Q., Xiang, J., Li, X., Chen, L., Xu, X., Tang, Y., Zhou, Q., Li, L., Zhang, H., Sun, H., Guan, A., Yang, Q., Yang, S., Xu, G. (2009) Stabilizing parallel G-quadruplex DNA by a new class of ligands: two non-planar alkaloids through interaction in lateral grooves, *Biochimie*, **91**, 811–819.
244. Giancola, C., Pagano, B. (2013) Energetics of ligand binding to G-quadruplexes, *Top. Curr. Chem.*, **330**, 211–242.
245. Kaluzhny, D., Ilyinsky, N., Shchekotikhin, A., Sinkevich, Y., Tsvetkov, P.O., Tsvetkov, V., Veselovsky, A., Livshits, M., Borisova, O., Shtil, A., Shcholkina, A. (2011) Disordering of human telomeric G-quadruplex with novel antiproliferative anthrathiophenedione, *PLoS One*, **6**, e27151.
246. McLuckie, K.I., Di Antonio, M., Zecchini, H., Xian, J., Caldas, C., Krippendorff, B.F., Tannahill, D., Lowe, C., Balasubramanian, S. (2013) G-quadruplex DNA as a molecular target for induced synthetic lethality in cancer cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 9640–9643.
247. Campbell, N.H., Patel, M., Tofa, A.B., Ghosh, R., Parkinson, G.N., Neidle, S. (2009) Selectivity in ligand recognition of G-quadruplex loops, *Biochemistry*, **48**, 1675–1680.
248. Luo, D., Mu, Y. (2015) All-atomic simulations on human telomeric G-quadruplex DNA binding with thioflavin T, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 4955–4967.
249. Cummaro, A., Fotticchia, I., Franceschin, M., Giancola, C., Petraccone, L. (2011) Binding properties of human telomeric quadruplex multimers: a new route for drug design, *Biochimie*, **93**, 1392–1400.
250. Petraccone, L. (2013) Higher-order quadruplex structures, *Top. Curr. Chem.*, **330**, 23–46.
251. Zhu, L.N., Wu, B., Kong, D.M. (2013) Specific recognition and stabilization of monomeric and multimeric G-quadruplexes by cationic porphyrin TMPipEOPP under molecular crowding conditions, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4324–4335.
252. Zhao, C., Wu, L., Ren, J., Xu, Y., Qu, X. (2013) Targeting human telomeric higher-order DNA: dimeric G-quadruplex units serve as preferred binding site, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 18786–18789.
253. Georgiades, S.N., Abd Karim, N.H., Suntharalingam, K., Vilar, R. (2010) Interaction of metal complexes with G-quadruplex DNA, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 4020–4034.
254. Ralph, S.F. (2011) Quadruplex DNA: a promising drug target for the medicinal inorganic chemist, *Curr Top Med Chem*, **11**, 572–590.
255. Zheng, K.W., Zhang, D., Zhang, L.X., Hao, Y.H., Zhou, X., Tan, Z. (2011) Dissecting the strand folding orientation and formation of G-quadruplexes in single- and double-stranded nucleic acids by ligand-induced photocleavage footprinting, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1475–1483.
256. Di Antonio, M., Rodriguez, R., Balasubramanian, S. (2012) Experimental approaches to identify cellular G-quadruplex structures and functions, *Methods*, **57**, 84–92.
257. Di Antonio, M., Doria, F., Richter, S.N., Bertipaglia, C., Mella, M., Sissi, C., Palumbo, M., Freccero, M. (2009) Quinone methides tethered to naphthalene diimides as selective G-quadruplex alkylating agents, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13132–13141.
258. Hampel, S.M., Sidibe, A., Gunaratnam, M., Riou, J.F., Neidle, S. (2010) Tetrasubstituted naphthalene diimide ligands with selectivity for telomeric G-quadruplexes and cancer cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 6459–6463.

259. Tseng, T.Y., Wang, Z.F., Chien, C.H., Chang, T.C. (2013) In-cell optical imaging of exogenous G-quadruplex DNA by fluorogenic ligands, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10605–10618.
260. Haudecoeur, R., Stefan, L., Denat, F., Monchaud, D. (2013) A model of smart G-quadruplex ligand, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 550–553.
261. Bare, G.A., Liu, B., Sherman, J.C. (2013) Synthesis of a single G-quartet platform in water, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 11985–11989.
262. Laguerre, A., Stefan, L., Larrouy, M., Genest, D., Novotna, J., Pirrotta, M., Monchaud, D. (2014) A twice-as-smart synthetic G-quartet: PyroTASQ is both a smart quadruplex ligand and a smart fluorescent probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 12406–12414.
263. Laguerre, A., Hukezalie, K., Winckler, P., Katranji, F., Chanteloup, G., Pirrotta, M., Perrier-Cornet, J.M., Wong, J.M., Monchaud, D. (2015) Visualization of RNA-Quadruplexes in Live Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 8521–8525.
264. Sissi, C., Gatto, B., Palumbo, M. (2011) The evolving world of protein-G-quadruplex recognition: a medicinal chemist's perspective, *Biochimie*, **93**, 1219–1230.
265. De Cian, A., Lacroix, L., Douarre, C., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Riou, J.F., Mergny, J.L. (2008) Targeting telomeres and telomerase, *Biochimie*, **90**, 131–155.
266. Bochman, M.L., Sabouri, N., Zakian, V.A. (2010) Unwinding the functions of the Pif1 family helicases, *DNA Repair (Amst)*, **9**, 237–249.
267. Biffi, G., Tannahill, D., Balasubramanian, S. (2012) An intramolecular G-quadruplex structure is required for binding of telomeric repeat-containing RNA to the telomeric protein TRF2, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 11974–11976.
268. Chakraborty, P., Grosse, F. (2011) Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes, *DNA Repair (Amst.)*, **10**, 654–665.
269. Gonzalez, V., Guo, K., Hurley, L., Sun, D. (2009) Identification and characterization of nucleolin as a *c-myc* G-quadruplex-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **284**, 23622–23635.
270. Fan, G., Lin, Y.X., Yang, L., Gao, F.P., Zhao, Y.X., Qiao, Z.Y., Zhao, Q., Fan, Y.S., Chen, Z., Wang, H. (2015) Co-self-assembled nano-aggregates of BODIPY amphiphiles for dual colour imaging of live cells, *Chem. Commun. (Camb.)*, **51**, 12447–12450.
271. von Hacht, A., Seifert, O., Menger, M., Schutze, T., Arora, A., Konthur, Z., Neubauer, P., Wagner, A., Weise, C., Kurreck, J. (2014) Identification and characterization of RNA guanine-quadruplex binding proteins, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 6630–6644.
272. Chiarella, S., De Cola, A., Scaglione, G.L., Carletti, E., Graziano, V., Barcaroli, D., Lo Sterzo, C., Di Matteo, A., Di Ilio, C., Falini, B., Arcovito, A., De Laurenzi, V., Federici, L. (2013) Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3228–3239.
273. Cogoi, S., Shchekotikhin, A.E., Xodo, L.E. (2014) *HRAS* is silenced by two neighboring G-quadruplexes and activated by MAZ, a zinc-finger transcription factor with DNA unfolding property, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8379–8388.
274. Raiber, E.A., Kranaster, R., Lam, E., Nikan, M., Balasubramanian, S. (2012) A non-canonical DNA structure is a binding motif for the transcription factor SP1 *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1499–1508.

275. Wolfe, A.L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V.K., Sanghvi, V.R., Mavrakis, K.J., Jiang, M., Roderick, J.E., Van der Meulen, J., Schatz, J.H., Rodrigo, C.M., Zhao, C., Rondou, P., de Stanchina, E., Teruya-Feldstein, J., Kelliher, M.A., Speleman, F., Porco, J.A., Jr., Pelletier, J., Ratsch, G., Wendel, H.G. (2014) RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer, *Nature*, **513**, 65–70.
276. Tosoni, E., Frasson, I., Scalabrin, M., Perrone, R., Butovskaya, E., Nadai, M., Palu, G., Fabris, D., Richter, S.N. (2015) Nucleolin stabilizes G-quadruplex structures folded by the LTR promoter and silences HIV-1 viral transcription, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8884–8897.
277. Brosh, R.M., Jr. (2013) DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 542–558.
278. Wickramasinghe, C.M., Arzouk, H., Frey, A., Maiter, A., Sale, J.E. (2015) Contributions of the specialised DNA polymerases to replication of structured DNA, *DNA Repair (Amst.)*, **29**, 83–90.
279. Eddy, S., Maddukuri, L., Ketkar, A., Zafar, M.K., Henninger, E.E., Pursell, Z.F., Eoff, R.L. (2015) Evidence for the kinetic partitioning of polymerase activity on G-quadruplex DNA, *Biochemistry*, **54**, 3218–3230.
280. Li, Q.J., Tong, X.J., Duan, Y.M., Zhou, J.Q. (2013) Characterization of the intramolecular G-quadruplex promoting activity of Est1, *FEBS Lett.*, **587**, 659–665.
281. Paeschke, K., Juranek, S., Rhodes, D., Lipps, H.J. (2008) Cell cycle-dependent regulation of telomere tethering in the nucleus, *Chromosome Res.*, **16**, 721–728.
282. Paeschke, K., Bochman, M.L., Garcia, P.D., Cejka, P., Friedman, K.L., Kowalczykowski, S.C., Zakian, V.A. (2013) Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs, *Nature*, **497**, 458–462.
283. Gray, L.T., Vallur, A.C., Eddy, J., Maizels, N. (2014) G quadruplexes are genomewide targets of transcriptional helicases XPB and XPD, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 313–318.
284. Kang, H.J., Le, T.V., Kim, K., Hur, J., Kim, K.K., Park, H.J. (2014) Novel interaction of the Z-DNA binding domain of human ADAR1 with the oncogenic c-Myc promoter G-quadruplex, *J. Mol. Biol.*, **426**, 2594–2604.
285. Phan, A.T., Kuryavyi, V., Darnell, J.C., Serganov, A., Majumdar, A., Ilin, S., Raslin, T., Polonskaia, A., Chen, C., Clain, D., Darnell, R.B., Patel, D.J. (2011) Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 796–804.
286. Gallo, A., Lo Sterzo, C., Mori, M., Di Matteo, A., Bertini, I., Banci, L., Brunori, M., Federici, L. (2012) Structure of nucleophosmin DNA-binding domain and analysis of its complex with a G-quadruplex sequence from the c-MYC promoter, *J. Biol. Chem.*, **287**, 26539–26548.
287. Hayashi, T., Oshima, H., Mashima, T., Nagata, T., Katahira, M., Kinoshita, M. (2014) Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: crucial importance of water entropy in molecular recognition, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 6861–6875.
288. Heddi, B., Cheong, V.V., Martadinata, H., Phan, A.T. (2015) Insights into G-quadruplex specific recognition by the DEAH-box helicase RHAU: Solution structure of a peptide-quadruplex complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 9608–9613.

289. Vasilyev, N., Polonskaia, A., Darnell, J.C., Darnell, R.B., Patel, D.J., Serganov, A. (2015) Crystal structure reveals specific recognition of a G-quadruplex RNA by a beta-turn in the RGG motif of FMRP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E5391–5400.
290. Takahama, K., Oyoshi, T. (2013) Specific binding of modified RGG domain in TLS/FUS to G-quadruplex RNA: tyrosines in RGG domain recognize 2'-OH of the riboses of loops in G-quadruplex, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 18016–18019.
291. Boyer, A.S., Grgurevic, S., Cazaux, C., Hoffmann, J.S. (2013) The human specialized DNA polymerases and non-B DNA: vital relationships to preserve genome integrity, *J. Mol. Biol.*, **425**, 4767–4781.
292. Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A., Shaw, P.G., Kim, M.S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J.D., Wang, J. (2014) C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease, *Nature*, **507**, 195–200.
293. Ivanov, P., O'Day, E., Emara, M.M., Wagner, G., Lieberman, J., Anderson, P. (2014) G-quadruplex structures contribute to the neuroprotective effects of angiogenin-induced tRNA fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 18201–18206.
294. Paeschke, K., Capra, J.A., Zakian, V.A. (2011) DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase, *Cell*, **145**, 678–691.
295. Castillo Bosch, P., Segura-Bayona, S., Koole, W., van Heteren, J.T., Dewar, J.M., Tijsterman, M., Knipscheer, P. (2014) FANCI promotes DNA synthesis through G-quadruplex structures, *EMBO J.*, **33**, 2521–2533.
296. Aguilera, A., Garcia-Muse, T. (2013) Causes of genome instability, *Annu. Rev. Genet.*, **47**, 1–32.
297. Lopes, J., Piazza, A., Bermejo, R., Kriegsman, B., Colosio, A., Teulade-Fichou, M.P., Foiani, M., Nicolas, A. (2011) G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication, *EMBO J.*, **30**, 4033–4046.
298. Ribeyre, C., Lopes, J., Boule, J.B., Piazza, A., Guedin, A., Zakian, V.A., Mergny, J.L., Nicolas, A. (2009) The yeast Pif1 helicase prevents genomic instability caused by G-quadruplex-forming CEB1 sequences *in vivo*, *PLoS Genet.*, **5**, e1000475.
299. Lormand, J.D., Buncher, N., Murphy, C.T., Kaur, P., Lee, M.Y., Burgers, P., Wang, H., Kunkel, T.A., Opresko, P.L. (2013) DNA polymerase delta stalls on telomeric lagging strand templates independently from G-quadruplex formation, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10323–10333.
300. Sarkies, P., Reams, C., Simpson, L.J., Sale, J.E. (2010) Epigenetic instability due to defective replication of structured DNA, *Mol. Cell*, **40**, 703–713.
301. Byrd, A.K., Raney, K.D. (2015) A parallel quadruplex DNA is bound tightly but unfolded slowly by pif1 helicase, *J. Biol. Chem.*, **290**, 6482–6494.
302. Duan, X.L., Liu, N.N., Yang, Y.T., Li, H.H., Li, M., Dou, S.X., Xi, X.G. (2015) G-quadruplexes significantly stimulate Pif1 helicase-catalyzed duplex DNA unwinding, *J. Biol. Chem.*, **290**, 7722–7735.
303. Chen, M.C., Murat, P., Abecassis, K., Ferre-D'Amare, A.R., Balasubramanian, S. (2015) Insights into the mechanism of a G-quadruplex-unwinding DEAH-box helicase, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2223–2231.
304. Qin, W., Lam, J.W., Yang, Z., Chen, S., Liang, G., Zhao, W., Kwok, H.S., Tang, B.Z. (2015) Red emissive AIE luminogens with high hole-transporting properties for efficient

- non-doped OLEDs, *Chem. Commun. (Camb.)*, **51**, 7321–7324.
305. Wu, W.Q., Hou, X.M., Li, M., Dou, S.X., Xi, X.G. (2015) BLM unfolds G-quadruplexes in different structural environments through different mechanisms, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 4614–4626.
306. Qureshi, M.H., Ray, S., Sewell, A.L., Basu, S., Balci, H. (2012) Replication protein A unfolds G-quadruplex structures with varying degrees of efficiency, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 5588–5594.
307. Ray, S., Qureshi, M.H., Malcolm, D.W., Budhathoki, J.B., Celik, U., Balci, H. (2013) RPA-mediated unfolding of systematically varying G-quadruplex structures, *Biophys. J.*, **104**, 2235–2245.
308. Hwang, H., Kreig, A., Calvert, J., Lormand, J., Kwon, Y., Daley, J.M., Sung, P., Opresko, P.L., Myong, S. (2014) Telomeric overhang length determines structural dynamics and accessibility to telomerase and ALT-associated proteins, *Structure*, **22**, 842–853.
309. Zhuang, X.Y., Yao, Y.G. (2013) Mitochondrial dysfunction and nuclear-mitochondrial shuttling of TERT are involved in cell proliferation arrest induced by G-quadruplex ligands, *FEBS Lett.*, **587**, 1656–1662.
310. Shuai, L., Deng, M., Zhang, D., Zhou, Y., Zhou, X. (2010) Quadruplex-duplex motifs as new topoisomerase I inhibitors, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **29**, 841–853.
311. Arimondo P.B., Riou J.F., Mergny J.L., Tazi J., Sun J.S., Garestier T., Hélène C. (2000) Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4832–4838.
312. Gao, J., Zybailov, B.L., Byrd, A.K., Griffin, W.C., Chib, S., Mackintosh, S.G., Tackett, A.J., Raney, K.D. (2015) Yeast transcription co-activator Sub1 and its human homolog PC4 preferentially bind to G-quadruplex DNA, *Chem. Commun. (Camb.)*, **51**, 7242–7244.
313. Metifiot, M., Amrane, S., Litvak, S., Andreola, M.L. (2014) G-quadruplexes in viruses: function and potential therapeutic applications, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12352–12366.
314. Tan, J., Vonrhein, C., Smart, O.S., Bricogne, G., Bollati, M., Kusov, Y., Hansen, G., Mesters, J.R., Schmidt, C.L., Hilgenfeld, R. (2009) The SARS-unique domain (SUD) of SARS coronavirus contains two macrodomains that bind G-quadruplexes, *PLoS Pathog.*, **5**, e1000428.
315. Mukundan, V.T., Do, N.Q., Phan, A.T. (2011) HIV-1 integrase inhibitor T30177 forms a stacked dimeric G-quadruplex structure containing bulges, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8984–8991.
316. Metifiot, M., Amrane, S., Mergny, J.L., Andreola, M.L. (2015) Anticancer molecule AS1411 exhibits low nanomolar antiviral activity against HIV-1, *Biochimie*, **118**, 173–175.
317. Fernando, H., Rodriguez, R., Balasubramanian, S. (2008) Selective recognition of a DNA G-quadruplex by an engineered antibody, *Biochemistry*, **47**, 9365–9371.
318. Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., Balasubramanian, S. (2013) Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells, *Nat. Chem.*, **5**, 182–186.
319. Biffi, G., Di Antonio, M., Tannahill, D., Balasubramanian, S. (2014) Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells, *Nat. Chem.*, **6**, 75–80.
320. Lam, E.Y., Beraldi, D., Tannahill, D., Balasubramanian, S. (2013) G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA, *Nat. Commun.*, **4**, 1796.

321. Fernando, H., Sewitz, S., Darot, J., Tavare, S., Huppert, J.L., Balasubramanian, S. (2009) Genome-wide analysis of a G-quadruplex-specific single-chain antibody that regulates gene expression, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6716–6722.
322. Bryan, T.M., Baumann, P. (2011) G-quadruplexes: from guanine gels to chemotherapeutics, *Mol Biotechnol*, **49**, 198–208.
323. Yang, D., Okamoto, K. (2010) Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs, *Future Med. Chem.*, **2**, 619–646.
324. Sekaran, V., Soares, J., Jarstfer, M.B. (2014) Telomere maintenance as a target for drug discovery, *J. Med. Chem.*, **57**, 521–538.
325. Gunes, C., Rudolph, K.L. (2013) The role of telomeres in stem cells and cancer, *Cell*, **152**, 390–393.
326. Smith, J.S., Chen, Q., Yatsunyk, L.A., Nicoludis, J.M., Garcia, M.S., Kranaster, R., Balasubramanian, S., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.P., Abramowitz, L., Schultz, D.C., Johnson, F.B. (2011) Rudimentary G-quadruplex-based telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 478–485.
327. Hasegawa, D., Okabe, S., Okamoto, K., Nakano, I., Shin-Ya, K., Seimiya, H. (2016) G-quadruplex ligand-induced DNA damage response coupled with telomere dysfunction and replication stress in glioma stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **471**, 75–81.
328. Chen, Z., Zheng, K.W., Hao, Y.H., Tan, Z. (2009) Reduced or diminished stabilization of the telomere G-quadruplex and inhibition of telomerase by small chemical ligands under molecular crowding condition, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10430–10438.
329. Heddi, B., Phan, A.T. (2011) Structure of human telomeric DNA in crowded solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9824–9833.
330. Wang, Z.F., Chang, T.C. (2012) Molecular engineering of G-quadruplex ligands based on solvent effect of polyethylene glycol, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8711–8720.
331. Buscaglia, R., Miller, M.C., Dean, W.L., Gray, R.D., Lane, A.N., Trent, J.O., Chaires, J.B. (2013) Polyethylene glycol binding alters human telomere G-quadruplex structure by conformational selection, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7934–7946.
332. Miller, M.C., Buscaglia, R., Chaires, J.B., Lane, A.N., Trent, J.O. (2010) Hydration is a major determinant of the G-quadruplex stability and conformation of the human telomere 3' sequence of d(AG₃(TTAG₃)), *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 17105–17107.
333. Petraccone, L., Malafronte, A., Amato, J., Giancola, C. (2012) G-quadruplexes from human telomeric DNA: how many conformations in PEG containing solutions?, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 2294–2305.
334. Kejnovska, I., Vorlickova, M., Brazdova, M., Sagi, J. (2014) Stability of human telomere quadruplexes at high DNA concentrations, *Biopolymers*, **101**, 428–438.
335. Lannan, F.M., Mamajanov, I., Hud, N.V. (2012) Human telomere sequence DNA in water-free and high-viscosity solvents: G-quadruplex folding governed by Kramers rate theory, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 15324–15330.
336. Noer, S.L., Preus, S., Gudnason, D., Aznauryan, M., Mergny, J.L., Birkedal, V. (2016) Folding dynamics and conformational heterogeneity of human telomeric G-quadruplex structures in Na⁺ solutions by single molecule FRET microscopy, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 464–471.

337. Petraccone, L., Garbett, N.C., Chaires, J.B., Trent, J.O. (2010) An integrated molecular dynamics (MD) and experimental study of higher order human telomeric quadruplexes, *Bio-polymers*, **93**, 533–548.
338. Wang, Q., Liu, J.Q., Chen, Z., Zheng, K.W., Chen, C.Y., Hao, Y.H., Tan, Z. (2011) G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6229–6237.
339. Marusic, M., Veedu, R.N., Wengel, J., Plavec, J. (2013) G-rich VEGF aptamer with locked and unlocked nucleic acid modifications exhibits a unique G-quadruplex fold, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9524–9536.
340. Martin-Pintado, N., Yahyaee-Anza-haee, M., Deleavey, G.F., Portella, G., Orozco, M., Damha, M.J., Gonzalez, C. (2013) Dramatic effect of furanose C2' substitution on structure and stability: directing the folding of the human telomeric quadruplex with a single fluorine atom, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 5344–5347.
341. Sagi, J. (2014) G-quadruplexes incorporating modified constituents: a review, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **32**, 477–511.
342. Hellman, L.M., Spear, T.J., Koontz, C.J., Melikishvili, M., Fried, M.G. (2014) Repair of O⁶-methylguanine adducts in human telomeric G-quadruplex DNA by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9781–9791.
343. Virgilio, A., Esposito, V., Mayol, L., Giancola, C., Petraccone, L., Galeone, A. (2015) The oxidative damage to the human telomere: effects of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine on telomeric G-quadruplex structures, *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 7421–7429.
344. Konvalinova, H., Dvorakova, Z., Renciuik, D., Bednarova, K., Kejnovska, I., Trantirek, L., Vorlickova, M., Sagi, J. (2015) Diverse effects of naturally occurring base lesions on the structure and stability of the human telomere DNA quadruplex, *Biochimie*, **118**, 15–25.
345. Cheong, V.V., Heddi, B., Lech, C.J., Phan, A.T. (2015) Xanthine and 8-oxoguanine in G-quadruplexes: formation of a G·G·X·O tetrad, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10506–10514.
346. Babinsky, M., Fiala, R., Kejnovska, I., Bednarova, K., Marek, R., Sagi, J., Sklenar, V., Vorlickova, M. (2014) Loss of loop adenines alters human telomere d[AG₃(TTAG₃)₃] quadruplex folding, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 14031–14041.
347. Hsu, S.T., Varnai, P., Bugaut, A., Reszka, A.P., Neidle, S., 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.
348. Islam, B., Stadlbauer, P., Krepl, M., Koca, J., Neidle, S., Haider, S., Sponer, J. (2015) Extended molecular dynamics of a *c-kit* promoter quadruplex, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8673–8693.
349. Zidanloo, S.G., Hosseinzadeh Colagar, A., Ayatollahi, H., Raoof, J.B. (2016) Downregulation of the WT1 gene expression via TMPyP4 stabilization of promoter G-quadruplexes in leukemia cells, *Tumour Biol.*, DOI 10.1007/s13277-016-4881-9
350. Agrawal, P., Hatzakis, E., Guo, K., Carver, M., Yang, D. (2013) Solution structure of the major G-quadruplex formed in the human VEGF promoter in K⁺: insights into loop interactions of the parallel G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10584–10592.

351. Salvati, E., Zizza, P., Rizzo, A., Iachettini, S., Cingolani, C., D'Angelo, C., Porru, M., Randazzo, A., Pagano, B., Novellino, E., Pisanu, M.E., Stoppacciaro, A., Spinella, F., Bagnato, A., Gilson, E., Leonetti, C., Biroccio, A. (2014) Evidence for G-quadruplex in the promoter of *vegfr-2* and its targeting to inhibit tumor angiogenesis, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 2945–2957.
352. Tong, X., Lan, W., Zhang, X., Wu, H., Liu, M., Cao, C. (2011) Solution structure of all parallel G-quadruplex formed by the oncogene *RET* promoter sequence, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6753–6763.
353. Viglasky, V. (2009) Platination of telomeric sequences and nuclease hypersensitive elements of human *c-myc* and *PDGF-A* promoters and their ability to form G-quadruplexes, *FEBS J.*, **276**, 401–409.
354. Qin, Y., Fortin, J.S., Tye, D., Gleason-Guzman, M., Brooks, T.A., Hurley, L.H. (2010) Molecular cloning of the human platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR-beta) promoter and drug targeting of the G-quadruplex-forming region to repress PDGFR-beta expression, *Biochemistry*, **49**, 4208–4219.
355. Shen, W., Gorelick, R.J., Bambara, R.A. (2011) HIV-1 nucleocapsid protein increases strand transfer recombination by promoting dimeric G-quartet formation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 29838–29847.
356. Farhath, M.M., Thompson, M., Ray, S., Sewell, A., Balci, H., Basu, S. (2015) G-Quadruplex-Enabling Sequence within the Human Tyrosine Hydroxylase Promoter Differentially Regulates Transcription, *Biochemistry*, **54**, 5533–5545.
357. Lim, K.W., Lacroix, L., Yue, D.J., Lim, J.K., Lim, J.M., Phan, A.T. (2010) Coexistence of two distinct G-quadruplex conformations in the hTERT promoter, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12331–12342.
358. 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.
359. Schonhoff, J.D., Bajracharya, R., Dhakal, S., Yu, Z., Mao, H., Basu, S. (2009) Direct experimental evidence for quadruplex-quadruplex interaction within the human ILPR, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3310–3320.
360. Chen, Y., Yang, D. (2012) Sequence, stability, and structure of G-quadruplexes and their interactions with drugs, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **Chapter 17**, Unit 17.5.
361. Wei, D., Parkinson, G.N., Reszka, A.P., Neidle, S. (2012) Crystal structure of a c-kit promoter quadruplex reveals the structural role of metal ions and water molecules in maintaining loop conformation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4691–4700.
362. Sun, H., Xiang, J., Shi, Y., Yang, Q., Guan, A., Li, Q., Yu, L., Shang, Q., Zhang, H., Tang, Y., Xu, G. (2014) A newly identified G-quadruplex as a potential target regulating Bcl-2 expression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3052–3057.
363. Sheu, S.Y., Huang, C.H., Zhou, J.K., Yang, D.Y. (2014) Relative stability of G-quadruplex structures: Interactions between the human Bcl2 promoter region and derivatives of carbazole and diphenylamine, *Biopolymers*, **101**, 1038–1050.
364. Onel, B., Carver, M., Wu, G., Timonina, D., Kalarn, S., Larriva, M., Yang, D. (2016) A New G-Quadruplex with Hairpin Loop Immediately Upstream of the Human BCL2 P1 Promoter Modulates Transcription, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 2563–2570.
365. Selvam, S., Yu, Z., Mao, H. (2016) Exploded view of higher order G-quadruplex structures through click-chemistry assisted single-

- molecule mechanical unfolding, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 45–55.
366. Podbevsek, P., Plavec, J. (2016) *KRAS* promoter oligonucleotide with decoy activity dimerizes into a unique topology consisting of two G-quadruplex units, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 917–925.
367. Cogoi, S., Zorzet, S., Rapozzi, V., Geci, I., Pedersen, E.B., Xodo, L.E. (2013) MAZ-binding G4-decoy with locked nucleic acid and twisted intercalating nucleic acid modifications suppresses *KRAS* in pancreatic cancer cells and delays tumor growth in mice, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4049–4064.
368. Agarwal, T., Roy, S., Kumar, S., Chakraborty, T.K., Maiti, S. (2014) In the sense of transcription regulation by G-quadruplexes: asymmetric effects in sense and antisense strands, *Biochemistry*, **53**, 3711–3718.
369. Holder, I.T., Hartig, J.S. (2014) A matter of location: influence of G-quadruplexes on *Escherichia coli* gene expression, *Chem. Biol.*, **21**, 1511–1521.
370. Cui, Y., Koirala, D., Kang, H., Dhakal, S., Yangyuoru, P., Hurley, L.H., Mao, H. (2014) Molecular population dynamics of DNA structures in a *bcl-2* promoter sequence is regulated by small molecules and the transcription factor hnRNP LL, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5755–5764.
371. Baral, A., Kumar, P., Halder, R., Mani, P., Yadav, V.K., Singh, A., Das, S.K., Chowdhury, S. (2012) Quadruplex-single nucleotide polymorphisms (Quad-SNP) influence gene expression difference among individuals, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3800–3811.
372. Ji, X., Sun, H., Zhou, H., Xiang, J., Tang, Y., Zhao, C. (2011) Research progress of RNA quadruplex, *Nucleic Acid Ther.*, **21**, 185–200.
373. Mullen, M.A., Assmann, S.M., Bevilacqua, P.C. (2012) Toward a digital gene response: RNA G-quadruplexes with fewer quartets fold with higher cooperativity, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 812–815.
374. Jodoin, R., Bauer, L., Garant, J.M., Mahdi Laaref, A., Phaneuf, F., Perreault, J.P. (2014) The folding of 5'-UTR human G-quadruplexes possessing a long central loop, *RNA*, **20**, 1129–1141.
375. Arora, A., Suess, B. (2011) An RNA G-quadruplex in the 3' UTR of the proto-oncogene *PIM1* represses translation, *RNA Biol.*, **8**, 802–805.
376. Endoh, T., Kawasaki, Y., Sugimoto, N. (2013) Suppression of gene expression by G-quadruplexes in open reading frames depends on G-quadruplex stability, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 5522–5526.
377. Xu, S., Li, Q., Xiang, J., Yang, Q., Sun, H., Guan, A., Wang, L., Liu, Y., Yu, L., Shi, Y., Chen, H., Tang, Y. (2015) Directly lighting up RNA G-quadruplexes from test tubes to living human cells, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 9575–9586.
378. Luke, B., Lingner, J. (2009) TERRA: telomeric repeat-containing RNA, *EMBO J.*, **28**, 2503–2510.
379. Collie, G.W., Sparapani, S., Parkinson, G.N., Neidle, S. (2011) Structural basis of telomeric RNA quadruplex-acridine ligand recognition, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2721–2728.
380. Zhang, D.H., Fujimoto, T., Saxena, S., Yu, H.Q., Miyoshi, D., Sugimoto, N. (2010) Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors, *Biochemistry*, **49**, 4554–4563.
381. Collie, G.W., Haider, S.M., Neidle, S., Parkinson, G.N. (2010) A crystallographic and modelling study of

- a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5569–5580.
382. Tang, C.F., Shafer, R.H. (2006) Engineering the quadruplex fold: nucleoside conformation determines both folding topology and molecularity in guanine quadruplexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5966–5973.
383. Joachimi, A., Benz, A., Hartig, J.S. (2009) A comparison of DNA and RNA quadruplex structures and stabilities, *Bioorg Med Chem*, **17**, 6811–6815.
384. Zhang, A.Y., Bugaut, A., Balasubramanian, S. (2011) A sequence-independent analysis of the loop length dependence of intramolecular RNA G-quadruplex stability and topology, *Biochemistry*, **50**, 7251–7258.
385. Reddy, K., Zamiri, B., Stanley, S.Y., Macgregor, R.B., Jr., Pearson, C.E. (2013) The disease-associated r(GGGGCC)_n repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures, *J. Biol. Chem.*, **288**, 9860–9866.
386. Dethoff, E.A., Chugh, J., Mustoe, A.M., Al-Hashimi, H.M. (2012) Functional complexity and regulation through RNA dynamics, *Nature*, **482**, 322–330.
387. Bugaut, A., Murat, P., Balasubramanian, S. (2012) An RNA hairpin to G-quadruplex conformational transition, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 19953–19956.
388. Halder, K., Largy, E., Benzler, M., Teulade-Fichou, M.P., Hartig, J.S. (2011) Efficient suppression of gene expression by targeting 5'-UTR-based RNA quadruplexes with bisquinolinium compounds, *Chembiochem*, **12**, 1663–1668.
389. Nagata, T., Sakurai, Y., Hara, Y., Mashima, T., Kodaki, T., Katahira, M. (2012) 'Intelligent' ribozyme whose activity is altered in response to K⁺ as a result of quadruplex formation, *FEBS J.*, **279**, 1456–1463.
390. Hu, Y., Wang, F., Lu, C.H., Girsh, J., Golub, E., Willner, I. (2014) Switchable enzyme/DNAzyme cascades by the reconfiguration of DNA nanostructures, *Chemistry*, **20**, 16203–16209.
391. Yamaoki, Y., Nagata, T., Mashima, T., Katahira, M. (2015) K⁺-responsive off-to-on switching of hammerhead ribozyme through dual G-quadruplex formation requiring no heating and cooling treatment, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **468**, 27–31.
392. Martadinata, H., Phan, A.T. (2014) Formation of a stacked dimeric G-quadruplex containing bulges by the 5'-terminal region of human telomerase RNA (hTERC), *Biochemistry*, **53**, 1595–1600.
393. Bugaut, A., Balasubramanian, S. (2012) 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4727–4741.
394. Millevoi, S., Moine, H., Vagner, S. (2012) G-quadruplexes in RNA Biology, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **3**, 495–507.
395. Shahid, R., Bugaut, A., Balasubramanian, S. (2010) The *BCL-2* 5' untranslated region contains an RNA G-quadruplex-forming motif that modulates protein expression, *Biochemistry*, **49**, 8300–8306.
396. Yu, C.H., Teulade-Fichou, M.P., Olsthoorn, R.C. (2014) Stimulation of ribosomal frameshifting by RNA G-quadruplex structures, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1887–1892.
397. Bhattacharyya, D., Nguyen, K., Basu, S. (2014) Rationally induced RNA:DNA G-quadruplex structures elicit an anticancer effect by inhibiting endogenous eIF-4E expression, *Biochemistry*, **53**, 5461–5470.
398. Oyaghire, S.N., Cherubim, C.J., Telfer, C.A., Martinez, J.A., Bruchez,

- M.P., Armitage, B.A. (2016) RNA G-Quadruplex Invasion and Translation Inhibition by Antisense gamma-Peptide Nucleic Acid Oligomers, *Biochemistry*, **55**, 1977–1988.
399. Panyutin, I.G., Onyshchenko, M.I., Englund, E.A., Appella, D.H., Neumann, R.D. (2012) Targeting DNA G-quadruplex structures with peptide nucleic acids, *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 1984–1991.
400. Rouleau, S.G., Beaudoin, J.D., Bisson, M., Perreault, J.P. (2015) Small antisense oligonucleotides against G-quadruplexes: specific mRNA translational switches, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 595–606.
401. Agarwala, P., Pandey, S., Mapa, K., Maiti, S. (2013) The G-quadruplex augments translation in the 5' untranslated region of transforming growth factor beta2, *Biochemistry*, **52**, 1528–1538.
402. Agarwala, P., Pandey, S., Maiti, S. (2014) Role of G-quadruplex located at 5' end of mRNAs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3503–3510.
403. Morris, M.J., Negishi, Y., Pázsint, C., Schonhoff, J.D., Basu, S. (2010) An RNA G-quadruplex is essential for cap-independent translation initiation in human VEGF IRES, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 17831–17839.
404. Bhattacharyya, D., Diamond, P., Basu, S. (2015) An Independently folding RNA G-quadruplex domain directly recruits the 40S ribosomal subunit, *Biochemistry*, **54**, 1879–1885.
405. Arnault, N., Van Beneden, A., Decottignies, A. (2012) Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1alpha, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 948–956.
406. Hirashima, K., Seimiya, H. (2015) Telomeric repeat-containing RNA/G-quadruplex-forming sequences cause genome-wide alteration of gene expression in human cancer cells *in vivo*, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2022–2032.
407. Redon, S., Zemp, I., Lingner, J. (2013) A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9117–9128.
408. Cusanelli, E., Chartrand, P. (2014) Telomeric noncoding RNA: telomeric repeat-containing RNA in telomere biology, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **5**, 407–419.
409. Huang, H., Suslov, N.B., Li, N.S., Shelke, S.A., Evans, M.E., Koldobskaya, Y., Rice, P.A., Piccirilli, J.A. (2014) A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 686–691.
410. Tanpure, A.A., Srivatsan, S.G. (2015) Conformation-sensitive nucleoside analogues as topology-specific fluorescence turn-on probes for DNA and RNA G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e149.
411. Xu, Y., Ishizuka, T., Yang, J., Ito, K., Katada, H., Komiyama, M., Hayashi, T. (2012) Oligonucleotide models of telomeric DNA and RNA form a Hybrid G-quadruplex structure as a potential component of telomeres, *J. Biol. Chem.*, **287**, 41787–41796.
412. Zheng, K.W., Xiao, S., Liu, J.Q., Zhang, J.Y., Hao, Y.H., Tan, Z. (2013) Co-transcriptional formation of DNA:RNA hybrid G-quadruplex and potential function as constitutional cis element for transcription control, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5533–5541.
413. Xiao, S., Zhang, J.Y., Zheng, K.W., Hao, Y.H., Tan, Z. (2013) Bioinformatic analysis reveals an evolutionary selection for DNA:RNA hybrid G-quadruplex structures as putative transcription regulatory elements in warm-blooded animals, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10379–10390.

414. Zhang, J.Y., Zheng, K.W., Xiao, S., Hao, Y.H., Tan, Z. (2014) Mechanism and manipulation of DNA:RNA hybrid G-quadruplex formation in transcription of G-rich DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 1381–1390.
415. Wanrooij, P.H., Uhler, J.P., Shi, Y., Westerlund, F., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M. (2012) A hybrid G-quadruplex structure formed between RNA and DNA explains the extraordinary stability of the mitochondrial R-loop, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10334–10344.
416. Wang, J., Haeusler, A.R., Simko, E.A. (2015) Emerging role of RNA*DNA hybrids in C9orf72-linked neurodegeneration, *Cell Cycle*, **14**, 526–532.
417. Groh, M., Lufino, M.M., Wade-Martins, R., Gromak, N. (2014) R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in Friedreich ataxia and fragile X syndrome, *PLoS Genet.*, **10**, e1004318.
418. Eddy, S., Ketkar, A., Zafar, M.K., Maddukuri, L., Choi, J.Y., Eoff, R.L. (2014) Human Rev1 polymerase disrupts G-quadruplex DNA, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3272–3285.
419. Li, D., Lv, B., Zhang, H., Lee, J.Y., Li, T. (2014) Positive supercoiling affiliated with nucleosome formation repairs non-B DNA structures, *Chem. Commun. (Camb.)*, **50**, 10641–10644.
420. Mergny, J.L. (2012) Alternative DNA structures: G4 DNA in cells: *itae missa est?*, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 225–226.
421. 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) Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 860–869.
422. Huang, W.C., Tseng, T.Y., Chen, Y.T., Chang, C.C., Wang, Z.F., Wang, C.L., Hsu, T.N., Li, P.T., Chen, C.T., Lin, J.J., Lou, P.J., Chang, T.C. (2015) Direct evidence of mitochondrial G-quadruplex DNA by using fluorescent anti-cancer agents, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10102–10113.
423. Biffi, G., Tannahill, D., Miller, J., Howat, W.J., Balasubramanian, S. (2014) Elevated levels of G-quadruplex formation in human stomach and liver cancer tissues, *PLoS One*, **9**, e102711.
424. Yang, T.L., Lin, L., Lou, P.J., Chang, T.C., Young, T.H. (2014) Detection of cell carcinogenic transformation by a quadruplex DNA binding fluorescent probe, *PLoS One*, **9**, e86143.
425. Hoffmann, R.F., Moshkin, Y.M., Mouton, S., Grzeschik, N.A., Kalicharan, R.D., Kuipers, J., Wolters, A.H., Nishida, K., Romashchenko, A.V., Postberg, J., Lipps, H., Berezikov, E., Sibon, O.C., Giepmans, B.N., Lansdorp, P.M. (2016) Guanine quadruplex structures localize to heterochromatin, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 152–163.
426. David, A.P., Margarit, E., Domizi, P., Banchio, C., Armas, P., Calcaterra, N.B. (2016) G-quadruplexes as novel cis-elements controlling transcription during embryonic development, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4163–4173.