

Tři jsou málo, pět je moc aneb seznamte se s kvadruplexy

Kvadruplexy, přesněji řečeno guaninové kvadruplexy, patří bezesporu mezi nejzajímavější molekuly DNA. I když jsou známy od 60. let 20. stol., zájem o ně vzrostl převážně v uplynulých 10 letech. Předpokládá se, že kvadruplexy by mohly hrát důležitou úlohu v klíčových biologických procesech, jakými jsou např. replikace a transkripce. Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že se již podařilo potvrdit jejich existenci *in vivo*. Kvadruplexy nabízejí svůj potenciál nejen v medicíně, představují také slibný materiál v oblasti nanotechnologií.

Když se řekne molekula DNA, každý si většinou představí její dvouřetězcovou formu stočenou do dobře známé dvoušroubovice. To ale není jediná forma DNA, která může existovat. Pokud se zaměříme pouze na počty řetězců, počet rovný dvěma není zdaleka konečný. Jsou známy triplexy tvořené třemi řetězci a skupina struktur tvořených čtyřmi řetězci. Ty se označují jako kvadruplexy (též tetraplexy, G4 DNA), často s přívlastkem guaninové, protože guanin je pro ně nepostradatelný. A právě s těmito molekulami, které jsou neobvyklé nejen svou strukturou, ale i vlastnostmi a možným způsobem využití, se nyní seznámíme.

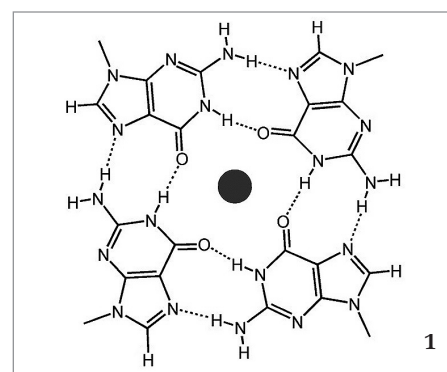
Struktura kvadruplexy

Základní stavební jednotkou kvadruplexy je guaninová tetráda (obr. 1), označovaná též jako kvartet. Jde o planární útvar, který tvoří čtyři cyklicky uspořádané guaniny, které jsou navzájem propojeny vodíkovými vazbami. Struktura guaninové tetrády byla poprvé identifikována v r. 1962 jako základní stavební jednotka hydrogelů tvořených 5'-GTP. Pomocí difrakční analýzy vláken M. Gellert a spolupracovníci zjistili, že guaniny planárně uspořádané v tetrádě jsou navzájem propojeny pomocí 8 vodíkových vazeb spojujících Watsonův-Crickův a Hoogsteenův konec sousedních bází. Ve středu každé tetrády je pak volný prostor, který je v důsledku orientace karbonylové skupiny do této oblasti záporně nabitý. V prostorovém uspořádání, kdy jsou jednotlivé tetrády navrstveny nad sebou, tvoří tento volný prostor kanál, obvykle zaplněný jednomocnými ionty. Většina guaninových kvadruplexů, jejichž strukturu známe, obsahuje buď

sodné ionty, které se nacházejí v rovině tetrády, nebo draselné ionty, které jsou však příliš velké, aby mohly zaujímat pozici v rovině tetrády, a nacházejí se proto v prostoru mezi jednotlivými tetrádami.

Kvadruplexy jsou velmi variabilní struktury a existuje mnoho kritérií, podle nichž je lze dělit. Jedním z nich je počet molekul DNA (tedy jednotlivých vláken), které kvadruplex tvoří. Známe kvadruplexy unimolekulární (tvořené jednou molekulou – např. obr. 2a) a bimolekulární (tvořené dvěma molekulami – např. obr. 2b, c). Tyto typy kvadruplexů musí obsahovat spojovací segmenty, označované jako smyčky, jež umožňují zapojení další sekvence guaninů do struktury kvadruplexu. Pak jsou zde ještě kvadruplexy označované jako lineární (obr. 2d), tvořené čtyřmi nezávislými vlákny DNA. Kvadruplexy se mohou lišit i vzájemnou orientací jednotlivých řetězců. Ta je buď paralelní (což je typické pro lineární kvadruplexy), nebo antiparalelní. Rozdíly panují také v orientaci glykozidické vazby u jednotlivých guaninů v řetězci. Kvadruplexy se mohou dále lišit počtem guaninových tetrád, které je tvoří. U kvadruplexů, jejichž strukturu známe, se počet tetrád pohybuje od dvou do čtyř.

Ačkoliv jsou kvadruplexy tvořeny především guaninovými tetrádami, existují i struktury, které z tohoto schématu vybočují. Jsou známy kvadruplexy obsahující smíšené tetrády G.C.G.C či A.T.A.T, nebo kvadruplexy s tetrádami typu A.A.A.A, T.T.T.T či C.C.C.C. Tyto neobvyklé tetrády mohou být začleněny do struktury kvadruplexu, jejich úloha je však doposud nejasná. Protože však obsahují redukovaný počet vodíkových vazeb, které jednotlivé komponenty propojují, jejich stabi-



1 Schéma guaninové tetrády, kterou tvoří čtyři guaniny spojené vodíkovými vazbami. Volný prostor uprostřed tetrády je obsazen iontem (většinou Na⁺ nebo K⁺).

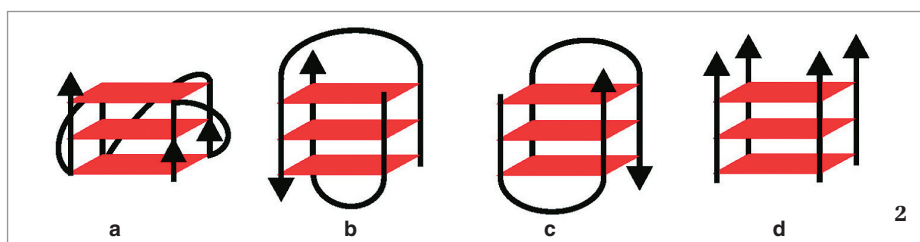
lita je mnohem nižší než u klasické guaninové tetrády. Kvadruplex také může obsahovat guaninové analogy, jako je např. inozin nebo thioguanin. Obecně zde ale platí stejné tvrzení, že tyto substituenty jsou tolerovány, avšak stabilitu kvadruplexů většinou neposilují.

Vraťme se ještě ke smyčkám, které jsou nedílnou součástí unimolekulárních a bimolekulárních kvadruplexů. Tyto smyčky jsou tvořeny převážně thyminy, ale vyskytují se zde i jiné báze nukleových kyselin, např. adenin. Také délka smyček může být velmi rozdílná. Rozlišujeme tři základní typy – diagonální, laterální (edge) a externí (groove) smyčky. Diagonální (obr. 2b) spojuje dva protilehlé řetězce, jejichž orientace je antiparalelní, a přechází přes oblast ústí centrálního kanálu. Laterální smyčka (obr. 2c) spojuje dva sousední řetězce, které jsou taktéž antiparalelní, za tvorby struktury známé jako vlásenka. Externí smyčka (obr. 2a) spojuje také dva sousední řetězce, jejich vzájemná orientace je však paralelní a smyčka je vedena přes boční část molekuly v oblasti žlábků (obr. 6). Tento typ se vyskytuje především v unimolekulárních kvadruplexech.

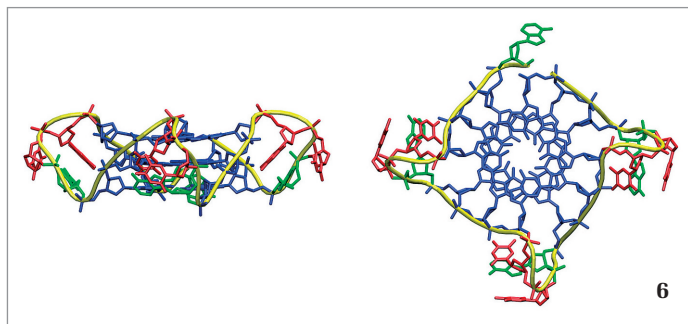
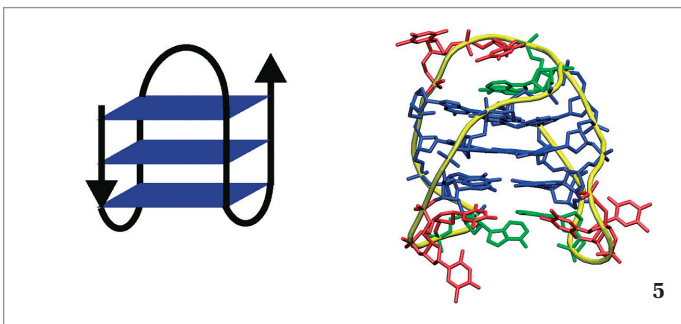
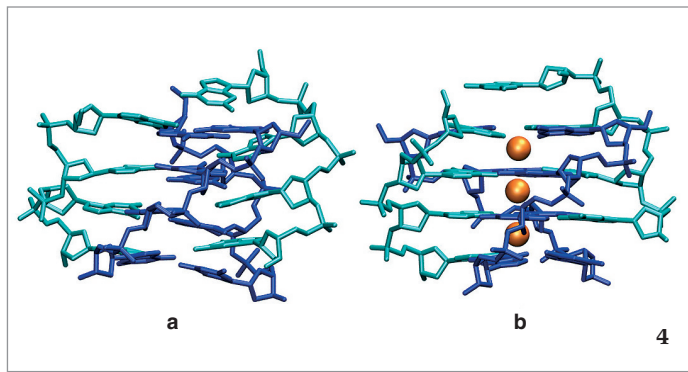
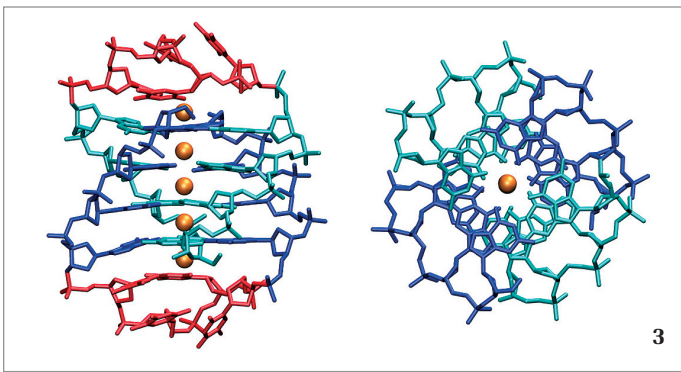
Je tedy zřejmé, že kvadruplexy mohou existovat v širokém spektru různých topologií. I přes tuto variabilitu je základ jejich struktury pořád stejný – tedy několik guaninových tetrád navrstvených nad sebe a centrální kanál obsazený ionty (obr. 3).

Klíčová vlastnost – neobvyklá stabilita

Jednou z významných vlastností guaninových kvadruplexů je jejich neobvyklá stabilita. Míru této stability ovlivňuje řada faktorů, jako např. počet tetrád, vzájemná orientace řetězců či délka a typ smyček. Obecně lze říci, že většina kvadruplexů je stabilní za fyziologických podmínek (jejich teplota tání je vyšší než 37 °C), a třeba paralelní kvadruplex tvořený čtyřmi tetrádami je natolik stabilní, že vydrží i několikaminutovou inkubaci při teplotě



2 Schematické znázornění vybraných kvadruplexů: a) unimolekulární paralelní kvadruplex se třemi externími smyčkami, b) bimolekulární antiparalelní kvadruplex se dvěma diagonálními smyčkami, c) bimolekulární antiparalelní kvadruplex se dvěma laterálními smyčkami, d) lineární paralelní kvadruplex.



3 Bimolekulární kvadruplex $d(G_4T_4G_4)_2$ tvořený telomerní sekvencí nálevníka *Oxytricha nova*. Guaniny z jednotlivých molekul jsou barevně rozlišeny pomocí světla a tmavě modré barvy. Thyminy, které tvoří diagonální smyčky, jsou označeny červeně. Draselné ionty v centrálním kanálu jsou oranžově. Vlevo pohled zepředu, vpravo pohled shora (pro přehlednost jsou odstraněny smyčky).

4 Výsledky molekulových simulací pro lineární kvadruplex: a) kvadruplex s neobsazeným centrálním kanálem je nestabilní a řetězce se vzájemně posouvají, b) přidáním iontů do centrálního kanálu dochází k obnovení struktury kvadruplexu, i když jeden řetězec zůstává vůči ostatním posunutý.

5 Unimolekulární kvadruplex tvořený lidskou telomerní sekvencí $AG_3(T_2AG_3)_3$ pozorovaný pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance v přítomnosti sodných iontů. Kvadruplex se nachází ve formě označované jako basket (košík) a obsahuje dvě laterální a jednu diagonální smyčku. Vlevo schéma, vpravo reálný pohled na molekulu.

6 Unimolekulární kvadruplex tvořený lidskou telomerní sekvencí $AG_3(T_2AG_3)_3$ pozorovaný pomocí rentgenostrukturní analýzy v přítomnosti draselných iontů. Molekula tvoří paralelní kvadruplex se třemi externími smyčkami a svým tvarem připomíná vrtuli. Vlevo pohled zepředu, vpravo pohled shora

100 °C. Co jsme zde ale ještě nezdůraznili, je skutečnost, že zcela zásadní pro stabilitu kvadruplexů je přítomnost iontů v centrálním kanálu. Studie provedené pomocí počítačových simulací metodou molekulové dynamiky ukázaly, že kvadruplex dobře toleruje přítomnost menšího počtu iontů v kanálu, aniž by došlo k narušení jeho struktury. To je také důležitý předpoklad pro plynulou výměnu iontů mezi kanálem kvadruplexu a okolním roztokem, k níž dochází na časové škále stovek mikrosekund až milisekund.

Položme si otázku, jak by se choval „prázdný“ kvadruplex. Mohli bychom ho však těžko pozorovat experimentálně, protože ionty tvoří nedílnou součást těchto struktur a bez nich nemohou existovat. Zde nám mohou opět pomoci počítačové simulace, které ukázaly, že prázdný centrální kanál v nepřítomnosti iontů okamžitě zaplní molekuly vody. Voda ale nedokáže kvadruplex dostatečně stabilizovat, a proto dochází k výrazným změnám jeho struktury (obr. 4a) – lze je charakterizovat jako vzájemné posouvání řetězců. Struktury s posunutými řetězci je možné následně stabilizovat umístěním iontů do kanálu (obr. 4b). Předpokládá se, že tyto struktury s posunutými řetězci by mohly představovat možné mezistavy při procesu formování kvadruplexu. Prázdný kvadruplex je též schopen spontánně zachytit iont z okolí a nasát ho do kanálu, což je spojeno s jeho okamžitou stabilizací.

Vraťme se však ještě k iontům. Vezme-li v úvahu existenci mnoha typů topologií kvadruplexu, lze cílenou volbou iontů ovlivnit, jaký kvadruplex se vytvoří? U některých sekvencí DNA se zdá, že ano. Příkladem může být lidská telomerní (viz dále) sekvence $AG_3(T_2AG_3)_3$, která tvoří unimolekulární kvadruplex. V přítomnosti iontů Na^+ byl pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance (dále jen NMR spektroskopie) pozorován antiparalelní kvadruplex s jednou diagonální a dvěma laterálními smyčkami (obr. 5), zatímco v krystalu v přítomnosti iontů K^+ jsou všechny řetězce paralelní, propojené třemi externími smyčkami (obr. 6). V současné době se však ukazuje, že lidská telomerní sekvence je schopna tvořit v roztoku antiparalelní kvadruplex jak v přítomnosti Na^+ , tak K^+ . Patrně zde hrají svou roli i další faktory, které zatím neznáme, ale dá se říci, že tato možnost zde existuje a jistě by našla praktické využití.

Kvadruplex ve své podstatě představuje strukturu se zcela jedinečnými vlastnostmi. Na jedné straně je zde jádro tvořené guaninovými tetradami a centrálním

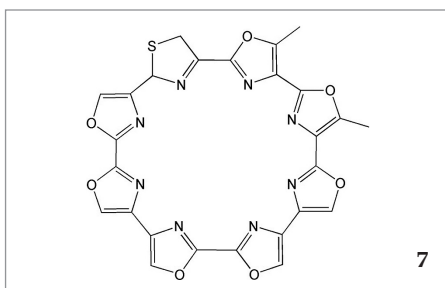
kanálem s ionty. Tato část molekuly je neobvykle stabilní a rigidní. Na druhé straně většina kvadruplexů obsahuje naopak velmi flexibilní smyčky, které mohou zaujímat řadu rozdílných geometrií a budou mít rozhodující vliv na interakce kvadruplexu s okolím.

Využití kvadruplexů – od léčiva po elektronickou součástku

Kvadruplexy jsou známy především ve spojitosti s telomery, které se nacházejí na koncích chromozomů (Živa 2002, 6: 245–248). Telomery jsou repetitivní nekódující sekvence, za normálních podmínek mají ochraňovat chromozom před nežádoucími interakcemi s ostatními chromozomy. V lidských buňkách mají obvykle délku 5–8 kilobází a jsou tvořeny tandemově se opakující sekvencí TTAGGG, bohatou na guanin. Jde o dvouřetězcové útvary s jednořetězcovým přesahem v délce 100–200 bází, který je nezbytný při procesu replikace DNA. S každým dělením buňky dochází ke zkracování telomer o 50–200 párů bází. Pokud délka telomer klesne pod kritickou mez, přestává se buňka dělit a umírá. Toto bohužel neplatí pro nádorové buňky, kde ke zkracování telomer nedochází a které jsou tím pádem nesmrtelné. Hlavní podíl na udržování délky telomer má enzym telomeráza. V normálních somatických buňkách je neaktivní, ale vykazuje aktivitu v 85–90 % nádorových buněk. Je tedy zřejmé, že telomery a telomeráza představují vysoce atraktivní cíl pro vývoj nových protirakovinných preparátů.

Enzym telomeráza, umožňující přidávat další opakující se sekvence na konec telomer, vyžaduje pro svou funkci jednořetězcový telomerní konec. Protože jsou telomerní sekvence bohaté na guanin, je zřejmé, že vytvoření kvadruplexu na konci telomery by zabránilo telomeráze v dalším prodlužování telomer. Pomocí malých molekul, které specificky interagují s kvadruplexy, by bylo možné tyto útvary dále stabilizovat a tím účinně inhibovat telo-





7

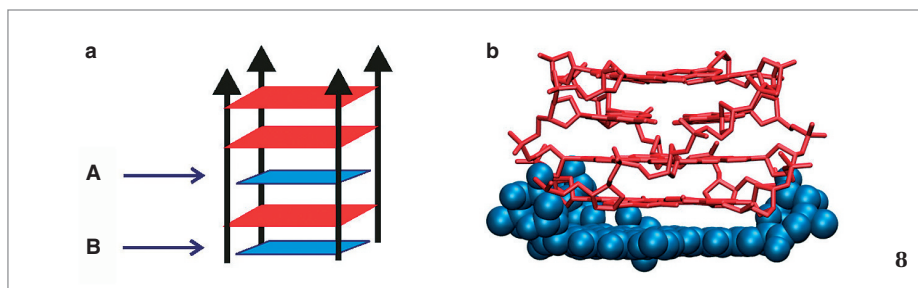
merázu. Tyto malé molekuly (označované jako ligandy) jsou obvykle polyaromatické heterocyklické sloučeniny, jejichž tvar umožňuje interakci s guaninovou tetradou. Z mnoha sloučenin můžeme jmenovat např. antrachinony, akridiny, triaziny atd. Za zmínku stojí i přírodní telomerázový inhibitor telomestatin (obr. 7) izolovaný z aktinobakterie *Streptomyces anulatus* s velkým potenciálem využití. Telomestatin se specificky váže na unimolekulární kvadruplex lidské telomerní sekvence, a co je velmi neobvyklé, dokonce indukuje tvorbu kvadruplexu v nepřítomnosti jednomocných iontů. Přednostně se váže na určitý typ geometrie (tzv. basket – košík, obr. 5) a dokáže provést konverzi kvadruplexu do tohoto tvaru z jiné geometrie.

Všimněme si nyní způsobu, jakým se ligand může na kvadruplex vázat. Pro tuto interakci se nabízejí dvě možnosti (obr. 8). Jednou je interkalace – vmezení – mezi dvě tetrády, druhou pak vertikální interakce (stacking) ligandu s krajní tetradou. Žádné experimenty dosud nepodpořily interakci ligandu pomocí interkalace mezi tetrady, jež by si vyžádala vzájemné oddálení tetrad a přerozdělení iontů, které se nacházejí v kanálu. Splnění těchto podmínek by bylo energeticky velmi náročné, a proto je zřejmé, že interakce ligandu s koncovou tetradou (která tento problém řešit nemusí) představuje základní způsob vazby pro tento typ interakcí.

Většina kvadruplexů obsahuje na svých koncích smyčky, které fungují jako flexibilní rozpoznávací elementy a vazbu ligandů významně ovlivňují. Rozhodující vliv zde mají faktory jako délka, sekvence a geometrie smyček.

Zmínili jsme kvadruplexy v souvislosti s telomerami, ale v genomu se vyskytují stovky až tisíce sekvencí bohatých na guanin, jež by mohly tvořit kvadruplexy. Na rozdíl od telomer však tyto sekvence tvoří klasickou dvouřetězcovou DNA, která je sama o sobě dosti stabilní a nemá snahu kvadruplexy tvořit. Existují ale situace, kdy se i tato dvouřetězcová DNA musí rozplést – a to v průběhu replikace a transkripce – a zde pak dojde ke vzniku podmínek pro možnou tvorbu kvadruplexů. Protože kvadruplexy jsou velmi stabilní, je energeticky velmi náročné vrátit takto modifikovanou DNA do původního stavu. Pokud bychom tedy dokázali cíleně indukovat vytvoření kvadruplexu v určitém místě genomu, mohli bychom takto selektivně vypínat či zapínat vybrané geny.

Až čtvrtinu celého genomu eukaryotických organismů (kam patří i člověk) tvoří tandemově se opakující sekvence DNA. Dříve se soudilo, že tato repetitivní DNA nemá žádnou biologickou funkci, ale v současné době je zřejmé, že svůj význam má.



8

Tandemové repetice se často nacházejí v regulačních oblastech genu a pokud se z nějakého důvodu výrazně prodlouží, dojde k abnormální expresi daného genu. Změny v délce tandemových repetací jsou spojeny s více než 40 lidskými chorobami, jako je např. syndrom fragilního chromozomu X. Tento syndrom je spojen s dědičnou mentální retardací a souvisí s expanzí trinukleotidové sekvence d(CGG) v oblasti genu FMR1. Za normálních okolností má tato repetice délku 2–52 opakování, ale u postižených jedinců může dosahovat 200 až 2 000 opakování. Tato sekvence však může tvořit kvadruplex, který by mohl zamezit dalšímu šíření syndromu. Kvadruplexy tvořené sekvencí d(CGG) byly pozorovány *in vitro*, ale pro jejich existenci *in vivo* hovoří objev proteinů, jež mají schopnost stabilizovat či destabilizovat tyto formy kvadruplexu a tím přispívají k regulaci genové exprese.

Proteinů, které specificky rozpoznávají kvadruplexy, existuje hned několik. Jsou to např. enzymy helikázy, DNA polymeráza nebo telomeráza. Skutečnost, že selektivně rozpoznávají tento nestandardní strukturální motiv, lze považovat za jeden z důkazů existence (nebo možnosti existence) kvadruplexů *in vivo*.

Otázkou zůstává, jakou biologickou roli tyto sekvence, které mohou tvořit kvadruplex, hrají – odpověď je však velmi složitá, protože zatím jde o nepřilíh prozkoumanou oblast. Jednou z možností, kterou jsme zde již zmínili, je regulace genové exprese, kdy kvadruplex (nebo další látka, která se na něj naváže) vytvoří blok, a tím zabrání procesu replikace či transkripce.

Kvadruplexy však nacházejí uplatnění i v oblasti techniky. Mohou např. sloužit jako předlohy pro syntézu nanostruktur a biomateriálů (např. hydrogely). Mohou také fungovat jako vysoce selektivní nosiče iontů (ionofory) pro cílené vylučování nebezpečných kationtů ohrožujících životní prostředí, jako je např. radioaktivní $^{226}\text{Ra}^{2+}$ způsobující rakovinu. Kvadruplexy na bázi guaninu a izoguaninu jsou schopny vylučovat tento iont dokonce i v přítomnosti alkalických iontů (Na^+ , K^+).

Vysoký potenciál mají kvadruplexy také v oblasti biosenzorů. Zde může jako příklad posloužit Thrombin Binding Aptamer (TBA), tedy krátký řetězec DNA v délce 15 nukleotidů, který se s vysokou afinitou a selektivitou váže na enzym proteázu trombin. V přítomnosti iontů K^+ tvoří TBA unimolekulární kvadruplex obsahující dvě tetrády a tři laterální smyčky. Mezi tetradami se pak nachází jediný iont K^+ , který je naprosto nezbytný pro stabilitu tohoto kvadruplexu. Bylo zjištěno, že TBA kvadruplex selektivně upřednostňuje K^+ dokonce i při vysoké koncentraci

7 Struktura ligandu telomestatinu – přírodního inhibitoru telomerázy

8 Interakce kvadruplexu s ligandy: a) schéma dvou možných způsobů interakce: A – interkalace (vmezení) mezi tetrady, B – vertikální interakce (stacking) s krajní tetradou, b) příklad interakce lineárního kvadruplexu se třemi molekulami cytostatika daunomycinu (modře). Všechny orig. N. Špačkové

iontů Na^+ v jeho okolí. Těto skutečnosti lze využít při konstrukci optických a elektronických biosenzorů. Např. jednořetězcové vlákno TBA, modifikované na obou koncích fluorescenční látkou, vytvoří v přítomnosti iontů K^+ kvadruplex, který bude poskytovat specifický fluorescenční signál, odlišný od signálu původního vlákna TBA. Tento signál můžeme detekovat, a tím měřit obsah K^+ v daném vzorku.

Oligonukleotidy s převahou guaninu – např. d(GGGGTTGGGG) – jsou schopny v prostředí monovalentních iontů tvořit dlouhá vlákna složená z kvadruplexů. Tato vlákna se označují jako G-dráty (G-wires). V současné době lze připravit kvadruplexové vlákno dokonce i z jediného řetězce obsahujícího tisíce guaninových bází. Taková vlákna mají délku asi desítky mikrometru a jsou viditelná pomocí AFM (Atomic Force Microscopy), což je mikroskopická technika využívající přitažlivé síly mezi atomy vzorku a detektoru k trojrozměrnému zobrazování povrchu. Vyznačují se vysokou stabilitou a protože obsahují kanál, v němž se mohou pohybovat kationty coby nositelé náboje, představují velmi perspektivní komponenty elektronických nanozařízení.

Kvadruplexy mohou také fungovat jako tzv. nanostroje či nanomotory. Zde může opět jako příklad posloužit kvadruplex TBA. Tato sekvence je schopna tvořit jak otevřenou formu molekuly – duplex, tak uzavřenou formu molekuly – kvadruplex. Cyklus nanostroje pak spočívá v přepínání mezi otevřenou a uzavřenou formou za účasti paliva, které rozplétá kvadruplex za vzniku duplexu (C-palivo), nebo odebere jeden řetězec z duplexu, aby zbývající mohl opět vytvořit unimolekulární kvadruplex (G-palivo).

V současné době máme velké množství informací o struktuře, chování či interakcích kvadruplexů s ligandy, ale mnohem méně toho víme např. o tom, jakým způsobem dochází k jejich formování. A co se týče jejich funkce v živých buňkách, existuje spíše více otázek než odpovědí. Doufejme, že tyto zajímavé neobvyklé struktury časem najdou široké uplatnění v řadě oborů lidské činnosti, lékařstvím počínaje a technikou konče.