

Untersuchung von Quadruplex-Konformationen der humanen Telomerensequenz mit Puls-EPR**

Vijay Singh, Mykhailo Azarkh, Thomas E. Exner, Jörg S. Hartig* und Malte Drescher

Guanosinreiche Nucleinsäuren sind bekannt dafür, dass sie in viersträngige Strukturen, so genannte Quadruplexe, falten.^[1,2] Von besonderem Interesse sind dabei die Telomere an den Chromosomenenden. Beim Menschen sind diese aus den Hexanucleotid-Abschnitten GGGTTA aufgebaut, an deren 3'-Ende sich die Telomere in einem aus 100 bis 200 Nucleotiden bestehenden Einzelstrang fortsetzen.^[3] Die Fähigkeit der Quadruplexe zur Faltung und Entfaltung lässt vermuten, dass sie die Telomererhaltung und den Zellzyklus steuern.^[4,5] Im Unterschied zu Duplexstrukturen sind Quadruplexe polymorph; ihre Struktur unterscheidet sich beispielsweise in der Orientierung der quadruplexbildenden Einzelstränge zueinander oder in der Anordnung der verbindenden Schleifenregionen. So wird die Struktur der humanen Telomersequenz unter anderem durch das im Quadruplex koordinierte einwertige Ion oder durch leichte Änderungen der Nucleotidsequenz drastisch beeinflusst.^[6-8]

Mithilfe von NMR-Spektroskopie und Kristallographie konnten hochaufgelöste Strukturen von menschlichen Telomer-Quadruplexen erhalten werden. Biophysikalische Studien liefern Hinweise darauf, dass verschiedene Strukturen vergleichbar stabil sind und unter physiologischen Bedingungen coexistieren können. Die hochauflösenden Techniken der Strukturanalyse können coexistierende Strukturen jedoch nicht abbilden, da diese Verfahren das Vorhandensein einer einzigen Spezies erfordern. Methoden wie die CD-Spektroskopie sind zwar hilfreich, ihre Ergebnisse werden aber leicht überinterpretiert,^[9] und dies hat in letzter Zeit zu kontroversen Diskussionen geführt. Wir haben die Quadruplexstrukturen von Telomersequenzen mit zwei Nitroxid-Spinmarkierungen unter annähernd physiologischen Bedingungen mithilfe einer Zweifrequenzmethode der Puls-Elektronenspinresonanz (EPR) untersucht (Abbildung 1 a).

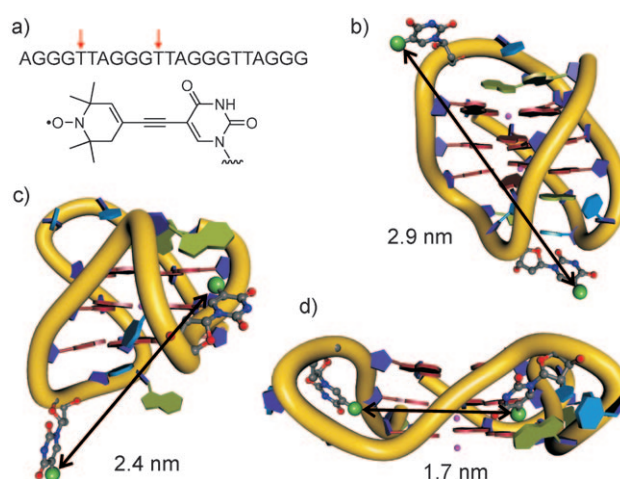


Abbildung 1. Menschliche Telomer-Quadruplexe: a) die untersuchte Sequenz; Pfeile markieren die 5-TEMPA-modifizierten Desoxyuridin-Reste. b–d) Unterschiedliche intramolekulare Quadruplexkonformationen, basierend auf hochaufgelösten Strukturen. Schwarze Pfeile deuten die Abstände der C5-Methyl-Kohlenstoffatome an, die gemäß der PDB-Struktur angegeben sind. b) NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur des antiparallelen Korbkonformations in Na⁺-haltiger Lösung (PDB: 143D).^[10] c) NMR-Struktur eines 3+1-Hybridquadruplexes einer leicht modifizierten Sequenz in K⁺-haltiger Lösung (PDB: 2GKU).^[11] d) Kristallstruktur der parallelen Propellerstruktur in Gegenwart von K⁺ (PDB: 1KF1).^[12]

Die Elektron-Elektron-Doppelresonanz-Spektroskopie (DEER oder PELDOR) ist das Mittel der Wahl, um zwischen verschiedenen Quadruplexkonformationen zu unterscheiden, da sie das Ausmessen von Abstandsverteilungen im Bereich von 1.5 bis 7.5 nm auch in strukturell heterogenen Systemen ermöglicht.^[13,14] Die wichtigsten intramolekularen Quadruplexkonformationen der menschlichen Telomersequenz sind in Abbildung 1 zusammengefasst: In Puffer mit Na⁺-Ionen wird für die Sequenz A(GGGTTA)₃GGG ein antiparalleler Quadruplex in einer „Korb“-Konformation gefunden.^[10] In Gegenwart des in der Zelle häufigeren Kations K⁺ ergibt die Kristallstrukturanalyse für die identische Sequenz eine Parallelorientierung aller Stränge („Propeller“-Form).^[12] Für eine nur leicht an beiden Enden modifizierte Sequenz (siehe Abbildung 1) wurden kürzlich von drei Gruppen mithilfe von NMR-spektroskopischen Analysen zwei verschiedene Formen einer parallel/antiparallelen 3+1-Hybridkonformation ermittelt.^[11,15-17] Viele Studien weisen darauf hin, dass in K⁺-haltiger Lösung eine Mischung verschiedener Konformationen vorhanden sei.^[8,18-32] Wenngleich mehrere dieser Arbeiten berichten, dass ein Gleichgewicht aus einer antiparallelen oder der 3+1-Hybridform und der parallelen Propellerform vorliege, stimmt die Mehrheit dieser Studien

[*] Dr. V. Singh,^[†] M. Azarkh,^[‡] Prof. Dr. T. E. Exner, Prof. Dr. J. S. Hartig, Dr. M. Drescher
Fachbereich Chemie, Konstanzer Graduiertenschule Chemische Biologie (KoRS-CB) und Zukunftskolleg
Universität Konstanz, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: joerg.hartig@uni-konstanz.de
Homepage: www.uni-konstanz.de/fuf/chemie/jhartig/

[†] Diese Autoren haben in gleichem Maße zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] J.S.H. dankt der VolkswagenStiftung für die Finanzierung einer Lichtenberg-Professur. Diese Arbeit wurde finanziell durch die DFG (DR 743/2-1) und das Zentrum für Mesoskopische Strukturen innerhalb der Exzellenzinitiative unterstützt. EPR = Elektronenspinresonanz.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902146> zu finden.

überein, dass die parallele Propellerform keine relevante Struktur in K^+ -haltiger Lösung sei.^[18–21, 26–29] Darüber hinaus wird die Diskussion durch einige widersprüchliche Ergebnisse intensiviert: Aus CD-Spektren der Sequenzen $(GGGTTA)_3GGG$ und $A(GGGTTA)_3GGG$ wird auf das ausschließliche Auftreten der antiparallelen Korbstruktur sowohl für Na^+ als auch für K^+ geschlossen.^[24] Vernetzungsexperimente mit Platinkomplexen ergaben für $A(GGGTTA)_3GGG$ und für $(TTAGGG)_4$, dass die antiparallele Korbstruktur für beide Ionen die wichtigste ist.^[28] Auf der anderen Seite zeigen biophysikalische Studien der Sequenz $(TTAGGG)_4$ in K^+ -haltiger Lösung nur die 3+1-Hybridstruktur.^[33] Es bleibt also unklar, welche Konformationen tatsächlich zu den beobachteten Mischungen beitragen, da eine eindeutige Zuordnung auf der Grundlage von CD-Spektren schwierig ist und andere Methoden nur sehr eingeschränkt Aufschluss bieten können. Wir führen hier die EPR-Spektroskopie an spinmarkierten Quadruplexstrukturen als Methode ein, um Abstände im Nanometerbereich zu messen, und weisen eine 1:1-Mischung der parallelen Propellerstruktur und der antiparallelen Korbstruktur in K^+ -haltiger Lösung nach.

Um Spinmarkierungen in DNA- oder RNA-Sequenzen einzubringen, wurden bereits unterschiedliche Ansätze genutzt.^[34–37] Neben Mobilitätsstudien zur DNA-Faltung mit herkömmlicher cw-EPR^[38] wurden Puls-DEER-Experimente ausgeführt, um Abstände in DNA-Modellsystemen zu messen.^[14, 34, 37, 39, 40] Wir haben Oligonucleotide mit TEMPA-Spinmarkierungen synthetisiert.^[41–43] Als Positionen für den Einbau der Spinmarkierungen wählten wir die Nucleotide 5 und 11 (Abbildung 1a), da Abstandsmessungen zwischen diesen Positionen es ermöglichen, die einzelnen Quadruplexkonformationen zu unterscheiden. Ein Vergleich der erwarteten Abstände zwischen allen Kombinationen der Desoxythymidin-Positionen ist in den Hintergrundinformationen enthalten. Spinmarkierte und nichtmodifizierte Sequenzen weisen sowohl in Na^+ - als auch in K^+ -haltiger Lösung jeweils identische CD-Spektren auf. Damit ist nachgewiesen, dass die TEMPA-Modifikationen die Quadruplextopologie nicht verändern (Abbildung S1).

Für die DEER-Experimente wurden die Konformationen der DNA in Na^+ - oder K^+ -haltiger Lösung mit $50\ \mu M$ Oligonucleotid gefaltet, durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei $T = 45\ K$ gemessen (siehe die Hintergrundinformationen). Für die Datenanalyse wurde DeerAnalysis2008 verwendet.^[44] Eine modellfreie Auswertung ergab, dass die Verteilung der Abstände zwischen den Spinmarkierungen durch eine oder zwei Gauß-Kurven charakterisiert werden kann. Sowohl Tikhonov-Regularisierung (siehe Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen) als auch Inspektion der quadratischen Abweichungen in den Gauß-Verteilungsmodellen ermöglichten es, eindeutig zu entscheiden, ob eine oder zwei Konformationen vorlagen. Die Coexistenz zweier Konformationen in K^+ -haltiger Lösung entspricht den Ergebnissen vieler Studien.^[8, 18–32]

Die Breite der Abstandsverteilungen (halbe Breite auf halber Höhe $\leq 1\ nm$) spiegelt die Flexibilität der spinmarkierten Trinucleotidschleifen wider. Die Nitroxid-markierten Strukturen wurden durch Energieminimierung unter Be-

rücksichtigung des Lösungsmittels (mit angepassten Kraftfeldparametern für die Markierungen) basierend auf AMBER modelliert. Die daraus erhaltenen Abstände sind vergleichbar zu denen in Abbildung 1. Allerdings ergaben auch Moleküldynamikrechnungen unter Berücksichtigung der Spinmarkierungen, dass die Abstände aus den energie-minimierten Strukturen nicht repräsentativ für das thermodynamische Ensemble der hochflexiblen Schleifenregionen sind. Deshalb wurden zur Strukturzuordnung die Abstände der 5-Methyl-Kohlenstoffatome der markierten Positionen aus der Proteindatenbank (PDB) entnommen. Eine intermolekulare Quadruplexbildung wurde durch Abstandsmessungen an einfach markierten Sequenzen ausgeschlossen. Diese Sequenzen wurden auch zur Bestimmung der lokalen Beweglichkeit verwendet, die ebenfalls die hohe Flexibilität der Schleifenregionen belegt (siehe die Hintergrundinformationen).

Es ist allgemein akzeptiert, dass in Na^+ -haltiger Lösung die antiparallele Korbstruktur (Abbildung 1b) als einzige Konformation vorliegt.^[10] Übereinstimmend finden wir mit DEER eine einzige Konformation mit einem Abstand von $(3.0 \pm 0.1)\ nm$ (Abbildung 2a und b). Dieser Abstand ent-

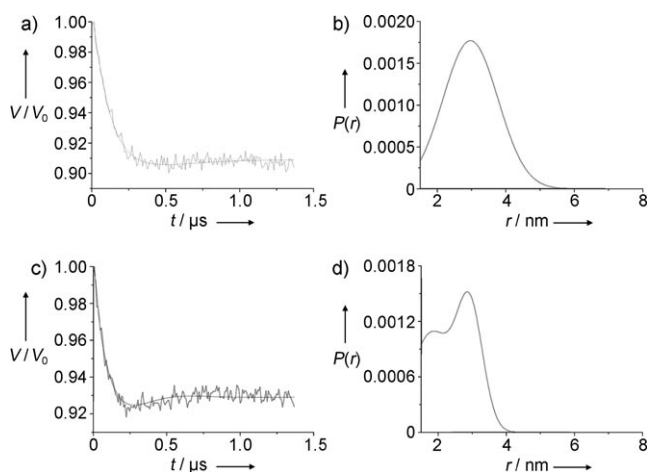


Abbildung 2. DEER-Daten: dipolare Entwicklung nach Hintergrundkorrektur für die Sequenz $A(GGGTTA)_3GGG$ in Na^+ - (a) und K^+ -haltiger Lösung (c), angepasst mit Kurven, denen Abstandsverteilungen mit einer bzw. zwei Gauß-Kurven zugrundeliegen. Die entsprechenden Abstandsverteilungen zeigen eine einzelne Konformation in Na^+ -haltiger (b) und zwei unterscheidbare Strukturen in K^+ -haltiger Lösung (d).

spricht dem, der gemäß der PDB-Struktur für die Korbstruktur zu erwarten war ($2.9\ nm$). Dagegen finden wir in K^+ -haltiger Lösung eine Mischung von zwei Konformationen. Die Anpassung mit nur einer sehr breiten Gauß-Kurve führt zu einer deutlich schlechteren Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, während ein Modell mit zwei Gauß-Kurven für Abbildung 2b wieder nur eine Konformation ergibt. Die beiden Quadruplexkonformationen in K^+ -haltiger Lösung liegen in relativen Anteilen von 55 und 45 % ($\pm 6\ %$) vor. Die erste Spezies ist durch einen Abstand von $(1.8 \pm 0.2)\ nm$ charakterisiert; dies entspricht dem Wert, den man für die parallele Propellerform erwartet (Abbildung 1d). Die zweite Konformation weist mit einem Abstand von $(3.0 \pm 0.1)\ nm$ einen zu den Ergebnissen in Na^+ -haltiger Lösung

identischen Abstand auf (Abbildung 2c und d). Diese Ergebnisse lassen auf eine Coexistenz von Propeller- und Korbkonformation schließen. Um eine falsche Zuordnung von Abständen zu Konformationen auszuschließen, wurde eine zusätzliche Vergleichssequenz synthetisiert. Diese Sequenz TT(GGGTTA)₃GGGA weicht nur leicht von der originalen Telomersequenz ab, faltet aber in K⁺-haltiger Lösung in die 3+1-Hybridform.^[11,17] Der gemäß der NMR-spektroskopisch ermittelten Struktur erwartete Abstand zwischen den Spinmarkierungen beträgt 2.4 nm (Abbildung 1c). Mit DEER messen wir einen Abstand von (2.6 ± 0.1) nm (siehe die Hintergrundinformationen, Abbildung S3), der zwischen den Werten für die parallele Propellerform und die Korbform für die Sequenz A(GGGTTA)₃GGG in K⁺-haltiger Lösung liegt.

Wir haben EPR-Abstandsmessungen zur Untersuchung von hochgradig polymorphen DNA-Quadruplexen ausgeführt. Im Widerspruch zu häufig geäußerten Hypothesen finden wir eine 1:1-Coexistenz der parallelen Propellerform und der antiparallelen Korbform für die untersuchte Telomersequenz. Trotzdem lässt sich die Bedeutung der 3+1-Hybridform keinesfalls ausschließen, da diese die bevorzugte Form von Sequenzen ist, bei denen die eigentliche Quadruplexsequenz von weiteren Nucleotiden flankiert wird. In diesem Zusammenhang erwarten wir von der hier eingeführten Methode wichtige Beiträge zur Untersuchung von Quadruplexkonformationen in längeren Sequenzen sowie in Systemen, die auch andere Moleküle enthalten. Da sich die Untersuchung eines Quadruplexes in Gegenwart von weiteren Oligonucleotiden, Proteinen oder niedermolekularen Verbindungen mit Methoden wie der CD-Spektroskopie teilweise schwierig gestaltet, ist der Einsatz der Puls-EPR besonders zur Aufklärung von Strukturen in komplexeren Systemen vielversprechend.

Eingegangen am 21. April 2009,
veränderte Fassung am 29. Juni 2009
Online veröffentlicht am 12. November 2009

Stichwörter: DEER-Spektroskopie · DNA-Quadruplexe · Humane Telomere · Nucleinsäurekonformationen · Spinmarkierung

- [1] J. R. Williamson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, 23, 703.
- [2] J. T. Davis, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 684; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 668.
- [3] W. E. Wright, V. M. Tesmer, K. E. Huffman, S. D. Levene, J. W. Shay, *Genes Dev.* **1997**, 11, 2801.
- [4] K. E. Huffman, S. D. Levene, V. M. Tesmer, J. W. Shay, W. E. Wright, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 19719.
- [5] A. J. Zaug, E. R. Podell, T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 10864.
- [6] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5402.
- [7] D. J. Patel, A. T. Phan, V. Kuryavyi, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 7429.
- [8] J. Dai, M. Carver, D. Yang, *Biochimie* **2008**, 90, 1172.
- [9] J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuik, M. Vorlickova, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 1713.

- [10] Y. Wang, D. J. Patel, *Structure* **1993**, 1, 263.
- [11] A. T. Phan, V. Kuryavyi, K. N. Luu, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 6517.
- [12] G. N. Parkinson, M. P. Lee, S. Neidle, *Nature* **2002**, 417, 876.
- [13] A. D. Milov, A. B. Ponomarev, Y. D. Tsvetkov, *Chem. Phys. Lett.* **1984**, 110, 67.
- [14] R. Ward, D. J. Keeble, H. El-Mkami, D. G. Norman, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1957.
- [15] J. Dai, M. Carver, C. Punchihewa, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 4927.
- [16] A. Matsugami, Y. Xu, Y. Noguchi, H. Sugiyama, M. Katahira, *FEBS J.* **2007**, 274, 3545.
- [17] K. N. Luu, A. T. Phan, V. Kuryavyi, L. Lacroix, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9963.
- [18] A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 2723.
- [19] P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 21858.
- [20] Y. He, R. D. Neumann, I. G. Panyutin, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 5359.
- [21] L. Ying, J. J. Green, H. Li, D. Klenerman, S. Balasubramanian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 14629.
- [22] A. Risitano, K. R. Fox, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2047.
- [23] I. N. Rujan, J. C. Meleney, P. H. Bolton, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 2022.
- [24] M. Vorlickova, J. Chladkova, I. Kejnovska, M. Fialova, J. Kypr, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 5851.
- [25] I. Ourliac-Garnier, M. A. Elizondo-Riojas, S. Redon, N. P. Farrell, S. Bombard, *Biochemistry* **2005**, 44, 10620.
- [26] A. Włodarczyk, P. Grzybowski, A. Patkowski, A. Dobek, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 3594.
- [27] J. Qi, R. H. Shafer, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 3185.
- [28] S. Redon, S. Bombard, M.-A. Elizondo-Riojas, J.-C. Chottard, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 1605.
- [29] J. Li, J. J. Correia, L. Wang, J. O. Trent, J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 4649.
- [30] A. Risitano, K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 2598.
- [31] P. Hazel, J. Huppert, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16405.
- [32] A. Benz, J. S. Hartig, *Chem. Commun.* **2008**, 4010.
- [33] C. Antonacci, J. B. Chaires, R. D. Sheardy, *Biochemistry* **2007**, 46, 4654.
- [34] O. Schiemann, N. Piton, Y. Mu, G. Stock, J. W. Engels, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5722.
- [35] S. Obeid, M. Yulikov, G. Jeschke, A. Marx, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6782.
- [36] O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B. E. Bode, T. F. Prisner, J. W. Engels, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 904.
- [37] N. Piton, Y. Mu, G. Stock, T. F. Prisner, O. Schiemann, J. W. Engels, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 3128.
- [38] A. Okamoto, T. Inasaki, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3415.
- [39] P. Z. Qin, I. S. Haworth, Q. Cai, A. K. Kusnetzow, G. P. Grant, E. A. Price, G. Z. Sowa, A. Popova, B. Herreros, H. He, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2354.
- [40] G. Z. Sowa, P. Z. Qin, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2008**, 82, 147.
- [41] P. M. Gannett, E. Darian, J. H. Powell, E. M. Johnson, *Synth. Commun.* **2001**, 31, 2137.
- [42] O. Frolow, B. E. Bode, J. W. Engels, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, 26, 655.
- [43] P. M. Gannett, E. Darian, J. Powell, E. M. Johnson, 2nd, C. Mundoma, N. L. Greenbaum, C. M. Ramsey, N. S. Dalal, D. E. Budil, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 5328.
- [44] G. Jeschke, V. Chechik, P. Ionita, A. Godt, H. Zimmermann, J. Banham, C. R. Timmel, D. Hilger, H. Jung, *Appl. Magn. Reson.* **2006**, 30, 473.