

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.02.025

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.02.025>

DNA 构象多态性对肿瘤生物学行为影响的研究进展

苏晓丽 综述 张声 审校

(福建医科大学附属第一医院病理科, 福州 350005)

[摘要] 获得性DNA损伤可导致体细胞基因突变或失活, 与肿瘤的发生发展有关。传统的研究主要针对B-DNA双链结构中Watson-Crick碱基互补对的改变对DNA生物学的影响。而对DNA构象多态性(特殊DNA序列分子间或分子内氢键、不成对碱基配对等形成的多种非B-DNA三维立体空间结构)的研究尚少。对非B-DNA结构的生物学功能、转录、翻译、基因损伤及其与疾病发生发展关系的深入了解, 可以提高人们对DNA三维立体空间结构对肿瘤生物学行为影响方面的认识。

[关键词] DNA构象多态性; 非B-DNA结构; 肿瘤生物学行为

Research progress in the effects of DNA conformation polymorphism on tumor biological behavior

SU Xiaoli, ZHANG Sheng

(Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

Abstract Acquired DNA damage can lead to mutation or inactivation of somatic genes, which is related to the occurrence and development of tumors. Traditional research focused on the effects of changes in Watson-Crick complementary base pairs in B-DNA double-stranded structures on DNA biology. However, there are few studies focusing on the various three-dimensional spatial structures of non-B-DNA formed by intermolecular or intramolecular hydrogen bonding or unpaired base pairing of specific DNA sequences, that is, DNA conformation polymorphism. An in-depth knowledge of the biological functions, transcription, translation, gene damage of non B-DNA structures and its association between the occurrence and development of disease can improve the understanding of three-dimensional DNA structure's impact on.

Keywords DNA conformation polymorphism; non-B-DNA structure; tumor biological behavior

肿瘤的发生发展是多步骤的过程, 获得性损伤因素损伤细胞DNA, 激活原癌基因, 失活肿瘤抑制基因, 引起体细胞基因和细胞凋亡调控基因

发生异常改变, 细胞周期失控, 组织细胞异常增生, 最终导致肿瘤的发生。1953年Watson和Crick提出DNA的右手双螺旋DNA结构即B-DNA结构

收稿日期 (Date of reception): 2019-11-20

通信作者 (Corresponding author): 张声, Email: zhgshg@126.com

基金项目 (Foundation item): 福建省自然科学基金 (2015J01452); 福建省医学创新课题 (2017-CX-28)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J01452) and the Medical Innovative Subject of Fujian Province (2017-CX-28), China.

的概念。传统的研究主要针对B-DNA结构中碱基互补对的改变对DNA生物学的影响。而DNA的三维立体空间结构,即定义和维持空间形式的“构型或构象”,主要涉及特殊DNA位点氢键等的构成,使DNA形成非B-DNA的三维立体构型。

1 DNA 构象多态性的生化特征

尽管染色体可能由单个双链DNA分子组成,但作为一种动态结构,由于其分子的柔性和可塑性,各个螺旋区段可以不同的构象存在,表现为不同位置的不同DNA区段显示各种非B-DNA构象,例如Z-DNA、发夹、十字形、三链体、四链体和i-基序等^[1],DNA呈现各种构象的生物学现象称为DNA构象多态性。

发夹或茎环结构是单链DNA的一部分,其自身折叠形成成对的双螺旋,以不成对的环结束。十字形结构由互补DNA链中的一对发夹结构组成,形成具有十字形构型的四向连接(图1)^[2]。

发夹或十字形结构是单链DNA的一部分,图示存在包含(CTG)_n·(CAG)_n,三核苷酸重复序列自身折叠形成成对的双螺旋,发夹结构以不成对

的环结束。十字形结构由互补DNA链中的一对发夹结构组成,形成具有十字形构型的四向连接。

DNA三链体即H-DNA是特征性的非B-DNA构象之一,高嘌呤-高嘧啶延伸的镜像重复通过Watson-Crick碱基对和Hoogsteen键配对形成分子内/分子间三链体结构,由镜像对称的一半单股折回通过Hoogsteen键配对与宿主双链体的一条链形成三链体结构^[2]。

G-四链体是由富含鸟苷(G)的DNA和RNA序列形成的四链核酸二级结构。它们通过4个鸟嘌呤碱基围绕Hoogsteen氢键形成环状结构,并通过环相互连接形成连续G-四链体构象^[2-3]。

i-基序(i-motif)结构由富含胞嘧啶(C)的DNA链在pH值微酸性或中性的环境下形成的四螺旋结构,由两条平行半双向化的C:C链与双链体碱基配对组成^[2,4]。

与经典的右旋B-DNA相比,Z-DNA表现为左旋双螺旋结构,其磷酸盐骨架具有Z字形图案(图2),Z-DNA的碱基位于相对远离轴的位置,并且存在单个深槽而不是在B-DNA中观察到的主要和次要凹槽。此外,碱基的糖苷键具有交替的顺式构象和反式构象^[2,4-6]。

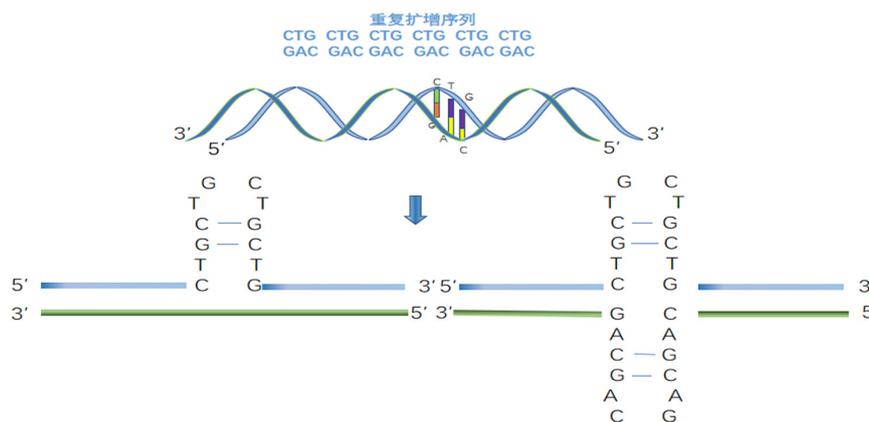


图1 发夹、十字形结构

Figure 1 Hairpin, cruciform structure



图2 Z-DNA

Figure 2 Z-DNA

Z-DNA结构由交替的嘌呤-嘧啶或嘧啶-嘌呤的二核苷酸重复序列形成,表现出左旋双螺旋及磷酸盐骨架,即锯齿形。

2 DNA 构象多态性的病理生理意义

DNA分子作为生命遗传信息的储存和转移平台,呈双链螺旋结构,其构象的多态性和动力学扩展了遗传信息库,在重要的细胞过程中起决定性作用,包括基因组重组、癌细胞永生和基因表达调控^[7],影响DNA损伤,修复和遗传不稳定性^[8]。

发夹和十字形结构的重复序列包括反向重复序列(invert repeat, IR),富含AT和GC的微卫星和小卫星^[9]。DNA复制、转录和/或DNA修复处理导致双链体的解旋,使单链重复序列有机会以分子内方式与其自身碱基配对,从而形成发夹或十字形结构^[10]。例如包含(CTG)_n·(CAG)_n,三核苷酸重复序列(trinucleotide repeat, TNR)代表构象灵活的基因组DNA序列,具有形成非B-DNA结构的能力,尤其是在DNA代谢过程中。这种类型的重复序列可以形成非B-DNA结构,如发夹和十字形,通过DNA复制、重组或修复的分子机制参与TNR的扩展。多种人类遗传性神经疾病、神经退行性疾病和神经肌肉疾病与TNR序列的扩展有关^[10-11]。Javadekar等^[12]在神经纤维瘤病I型中观察到一种易位t(17;22)(q11.2;q11.2),其中的断裂点位于NF1基因内含子的195 bp回文AT富集重复(PATRR)区域中。PATRR以茎环/发夹或以十字形式挤出,该结构可诱导DNA双链断裂(double-strand break, DSB)引起基因组不稳定,从而导致重排。Dere等^[13]发现四核苷酸重复(CCTG CAGG)形成的发夹结构与2型强直性营养不良相关的遗传不稳定性有关。

多嘌呤-聚嘧啶镜像重复可以通过Hoogsteen键结合采用分子内三链体结构,当镜像对称的一半与下面的双链体富含嘌呤区域的主沟以Hoogsteen键结合时,留下单链区域。可形成二价阳离子(例如Mg²⁺)依赖性R*RY型(R:嘌呤,Y:嘧啶,*Hoogsteen键)三链体,或酸性pH依赖性Y*RY型三链体。每种类型三链体存在两种异构体,根据Hoogsteen氢键结合DNA(5-或3-)的端向,可产生4种可能的三链体异构体。H-DNA结构提供了单链区域,可以通过与同源区域配对而潜在启动遗传重组。无论目标双链体DNA中的多嘌呤-聚嘧啶束线性序列如何,都可能通过采用H-DNA结构将单链区域作为同源性搜索的位点刺激短寡脱氧核苷酸形成D-环,之后Hoogsteen键配对的

H-DNA结构的第三条链可以与同源双链体释放的单链通过Watson-Crick碱基配对形成Holliday连接。因此,来自两个H-DNA结构的单链是互补的,并且可以形成Watson-Crick碱基对,从而稳定H-DNA结构。三链体区域的解旋及该复合物中双链体的形成可导致中间体与重组期间形成的Holliday连接,这些都将引起基因组的不稳定性,诱导DSB发生,阻滞复制,导致疾病的发生^[10,14]。Pandey等^[6]合成了三链体类似物,包括分子内和分子间三链体构型,通过这些结构研究T7 RNA聚合酶的转录,结果表明H-DNA结构可阻断RNA聚合酶,阻断转录。另外,可以形成分子内三链体的序列在基因组DNA中非常常见,在性染色体的假常染色体区域富集,这对于减数分裂和重组以及参与大脑细胞通讯的基因是必不可少的。同时也是真核启动子的常见元件,包括c-MYC,涉及许多疾病相关基因的表达。Helma等^[15]研究表明扩增的(GAA)_n重复序列很容易形成非B-DNA结构,即分子内三链体结构(intramolecular triplex, H-DNA),与frataxin基因的转录沉默导致的弗雷德里希共济失调(Friedrich ataxia)有关。在弗雷德里希共济失调患者中发现的长GAA重复序列,可能具有三链体构象的潜力,导致重复序列的高水平扩增和缺失。Vetcher等^[16]发现该区域的不稳定性是由两个三链体结构相互作用形成的六链“黏性”DNA引发的。

G-四链体DNA在鸟嘌呤(G)序列的串联重复中形成。在分子内或分子间,4个G碱基在方形平面环状阵列中通过Hoogsteen氢键结合在一起,来自每个G-道的四个鸟嘌呤残基组装成四边形,称为G-四联体。多个G-四联体相互堆叠组装成G-四链体,其中每个G-道作为四链体茎。最后,单价阳离子嵌入G-四联体间进一步稳定构象形成单价阳离子(例如K⁺或Na⁺)稳定的G4-DNA结构^[17]。由于核酸链在折叠过程中的各种取向,G-四链体结构可以分为不同构象,包括平行、反平行和混合构象^[18]。在整个人类基因组中发现G-四链体宿主序列,特别是在启动子和端粒中。

G-四链体参与多种细胞事件,包括DNA复制、DNA损伤修复、转录、RNA处理、翻译和表观遗传调控。G-四链体可阻断复制叉,在有丝分裂期间抑制基因复制,在抑制DNA损伤修复中起作用。位于转录起始位点(transcription start site, TSS)上游或下游的G-四链体可以抑制或促进转录。此外,G-四链体的形成可以募集某些翻译起始蛋白或阻断这些蛋白与非翻译区(untranslated

region, UTR)的结合, 从而对翻译产生影响^[13]。胰岛素连接的多态性区域(insulin-linked polymorphism region, ILPR)位于胰岛素启动子的上游。ILPR在病因学上与肥胖、I型和II型糖尿病以及多囊卵巢综合征相关。而重复的5'-ACAGGGGTGTGGGG作为ILPR主要序列形成G-四链体。通过单分子水平的机械纳米操作, Yu等^[3]揭示反平行ILPR G-四链体的解链力大于具有解旋酶活性的酶的失速力, 表明ILPR G-四链体可以阻止这些酶在DNA模板上进展, 与ILPR相关疾病的发生发展有关。人解旋酶WRN参与端粒维持并且对G-四链体具有解旋活性, 以高亲和力结合G-四链体的保守RQC结构域。WRN突变导致其对G-四链体解旋活性的丧失, 诱发Werner综合征, 引起过早衰老(成年早衰)^[2]。在复制过程中, G4结构在缺乏DOG-1解旋酶或DOG-1解旋酶的同源物FANCI的情况下未能解旋G-四链体, 导致复制过程中产生的新生链小ssDNA缺口, DSB的发生积累大基因组DNA缺失, 其中FANCI解旋酶的缺失与Fanconi贫血有关^[19-21]。解旋酶ATRX与人类大脑功能有关。男性ATRX种系突变产生罕见的先天性神经发育疾病, 与智力障碍, 即X连锁的 α 地中海贫血智力障碍(X-linked alpha thalassemia mental retardation, ATR-X)综合征有关, 致病基因ATRX编码SWI/SNF样解旋酶蛋白ATRX, 其中包含两个基序: 1)ATRX-DNMT3-DNMT3L结构域, 结合至组蛋白H3尾部和修饰的组蛋白H3K9me3^[22]。Law等^[23]通过全基因组分析在整个基因组广泛的串联重复序列中检测到ATRX, 包括rDNA重复序列、端粒重复序列。通过对原始人类红系细胞和小鼠胚胎干细胞ChIP-seq分析确定ATRX富含G的可变数目串联重复序列, 这些重复序列均可形成G-四链体。结果表明G-四链体结构的形成可能与ATR-X综合征相关^[22]。G4-DNA失调与人类疾病有关, 包括神经功能障碍、加速衰老和增加患癌症的风险, Haeusler等^[24]研究表明在C9orf72非编码区中六核苷酸重复扩增(hexanucleotide repeat evade, HRE), (GGGGCC)_n与神经变性疾病肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)和额颞叶痴呆(frontotemporal dementia, FTD)相关, C9orf72 HRE DNA/RNA序列结构多态性, DNA和RNA六核苷酸重复序列的G-四链体结构构象是C9orf72 HRE连锁ALS/FTD致病机制的基本决定因素。

i-基序结构由富含胞嘧啶(C)链在酸性条件下形成插入四螺旋四分子结构。其由两个平行链双链体组成, 以反平行方向插入并通过半质子化胞

嘧啶-胞嘧啶+(C:C+)碱基对保持在一起。与G4结构类似, 由于4个不同的空间排列, i-基序可以通过2个(二聚体)或4个(四聚体)分开的DNA链的结合以分子间方式折叠, 或形成分子内结构(单体)。i-基序存在于调节区中或附近, 位于人类端粒DNA启动子区域, 参与生物过程, 例如复制、调节和转录等^[25]。大量数据表明i-基序结构可能参与转录调控, 转录活性较高的细胞周期G₁/S期i-基序数量较高。Takahashi等^[26]通过DNA聚合酶Klenow片段(klenow fragment, KF)研究了几种非经典DNA结构对DNA复制的影响。发现插入复制反应的模板链中不同的i-基序形成序列使DNA聚合酶停滞并阻碍DNA复制或修复。Kovanda等^[27]发现C9orf72中G4C2六核苷酸重复扩增突变(hexanucleotide repeat expansion mutation, HREM)相关的肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)和额颞叶变性(frontotemporal lobe degeneration, FTL)中HREM纯G富集也形成i-基序, 可以解释HREM复制和转录的不稳定性。

Z-DNA是在交替的嘌呤-嘧啶或嘧啶-嘌呤(APP)二核苷酸重复序列中形成的高级结构, 其中Z-DNA倾向以GC>CA>TA顺序形成, 通过直接与B-DNA相互作用的Z-DNA结合蛋白(Z-DNA binding protein, ZBP)诱导和稳定Z-DNA。体外研究报道, 碱基修饰如胞嘧啶和鸟嘌呤的甲基化以及腺嘌呤的脱氨作用增加了Z-DNA稳定化倾向, 组蛋白乙酰化也具有诱导B至Z-DNA转换倾向。Z-DNA具有免疫原性, 与系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、克罗恩病、多发性神经根神经炎和ALS有关, 患者自发产生抗Z-DNA抗体。另外, Khan等^[28]发现具有(CCTG)_n(CCAGG)_n重复的Z-DNA结构可通过减少2型肌强直性营养不良(DM2)基因中潜在的滑链DNA的形成而对DNA具有保护作用。另外, Renčiuk等^[29]发现与脆性X染色体相关的CGG重复和与骨骼发育异常相关的GAC重复也可形成Z-DNA。Ravichandran等^[30]发现阿尔茨海默病患者海马中存在Z-DNA, 暗示Z-DNA在神经退行性疾病中的作用。

3 DNA 构象多态性的检测方法

DNA构象多态性涉及许多生物过程, 通过特定的检测方法可检测各种非B-DNA结构。

3.1 单分子实时测序数据

单分子实时(single molecule real time, SMRT)

测序聚合动力学数据是在每个SMRT测序实验过程中产生的, 可用于研究DNA修饰、聚合动力学研究、发现新的非B-DNA结构、测序错误分析和聚合酶动力学与错误率的相关性分析。通过使用工程化噬菌体phi29聚合酶记录脉冲间持续时间(inter-pulse durations, IPD), 即两个荧光脉冲之间的时间, 对应两个连续核苷酸掺入。使用IPD作为聚合动力学量度, 可以直接、同时研究几种非B-DNA基序类型对聚合动力学和错误的全基因组影响。通过SMRT测序数据可研究聚合酶的准确性是否受到合成的DNA序列和结构特征的影响^[31]。

3.2 时间分辨荧光光谱法

通过时间分辨荧光光谱法为纳秒级时间范围内研究pH值从4到7之间的i-基序动态图像。将F-TT-Q序列作参考序列, 通过时间分辨荧光光谱法记录稳态吸收和荧光发射光谱, 观察到当F-TT-Q序列pH值降低时, 荧光强度降低, 提示随着pH值降低, 荧光减少与序列折叠密切相关, pH 4.5时产生的i-基序结构稳定性更高。通过数据矩阵D(m×n)根据pH从4到7的变化按行对衰减进行排序。使用时间相关的单光子计数(time-correlated single-photon counting, TCSPC)分析, 显示在pH值<7时, i-基序结构链内接触形成和解离速度比开放形式快10倍^[32]。

3.3 非-B DNA 基序搜索工具

非-B DNA基序搜索工具(non-B DNA motif search tool, nBMST)是网络资源, 允许用户提交一个或多个DNA序列以搜索反向重复序列(十字形DNA)、镜像重复序列(三重DNA)、直接/串联重复序列(滑动/发夹结构)、G4基序(G-四链体)、交替嘌呤-嘧啶束(左手Z-DNA)和无相重复(静态弯曲), 单击即可自定义多个主题搜索, 无需访问多个Web服务器。可搜索到在任何核苷酸序列中形成非B-DNA结构的重复基序, 阐明非B-DNA形成基序与癌症或遗传性疾病等的关联。Cer等^[33]从欧洲核苷酸档案库下载了43个与低级别神经胶质瘤和星形细胞瘤相关的RAF融合基因的序列, 发现40例发生了简单的KIAA1549-BRAF重排, 2例(PA27和PA30)基因组重排复杂。使用nBMST搜索, 共发现21个形成非B-DNA基序, 其中12个(57.14%)来自复杂重排的PA27(FR799551)和PA30(FR799552-3), 鉴定了新的非B-DNA形成基序^[33]。

3.4 圆二色光谱

圆二色(circular dichroism, CD)光谱是一种

测量左右圆偏振光吸收差异的光学技术, 是确定生物分子构象转变的高度灵敏技术, 可区分不同异构体之间的亚构象, 广泛应用于核酸研究^[34]。Verma等^[35]捕获存在/不存在免疫球蛋白样和纤连蛋白III型结构域(immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1, IGFN1)-G和C序列的CD光谱, 分析显示平行G-四链体特征性的240 nm负峰和263 nm正峰, 证明G-四链体结构的存在。

还有许多用于DNA多态性检测的方法, 如核磁共振和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)、原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)等, 可用于进一步了解非B-DNA结构的作用机制。

4 DNA 构象多态性在肿瘤发生发展中的意义

4.1 DNA 构象多态性与肿瘤的发生

基因组不稳定性是大多数癌症的标志。体细胞遗传不稳定性导致易位、大量插入、缺失和重复的产生, 不仅重塑癌症基因组, 而且导致基因融合, 赋予细胞致癌潜力, 促进肿瘤发生^[36]。非B-DNA序列的不稳定性是基因组诱变的热点, 诱导肿瘤发生。

易碎位点是染色体上特异的基因座, 在暴露于部分复制压力下可形成缺口、狭窄和断裂, 并在肿瘤中重新排列。Zlotorynski等^[37]发现常见易碎位点FRA7I富含AT和TA二核苷酸, 可能发生发夹结构导致自发染色体断裂。通过染色体重排分析, Ciullo等^[9]发现乳腺癌细胞中含有发夹结构的共同易碎位点FRA7I的染色体区域参与染色体扩增, 引发重排。

c-MYC基因异常导致多种形式的癌症, c-MYC基因易位的Burkitt淋巴瘤进展快速。Umek等^[38]研究表明易位点位于c-MYC基因P1启动子上游的核酸酶超敏性元件III1(NHE III1), 可形成非B-DNA结构, 即H-DNA, 导致基因突变频率增加约20倍。Burkitt淋巴瘤和BALB/c浆细胞瘤等染色体易位相关性疾病中, 易位c-MYC基因的断点聚集在启动子区H-DNA形成序列周围。Wang等^[39]研究c-MYC基因内源性H-DNA形成序列和具有不同H-DNA形成潜能的3个模型H-DNA形成序列, 即GG32, AG32和GA32, 发现镜面重复序列GG32形成效率最高的H-DNA。通过构建质粒、转染COS-7细胞, 确定H-DNA能诱导哺乳动物细胞高水平的突变频率, 与H-DNA构象相对能力相关。H-DNA形成序列通

过诱导DSB, 参与c-MYC易位, 引发诱变, 提示H-DNA是DSB引起疾病的动力, 导致遗传不稳定的原因, 促进肿瘤的发生。

已知Z-DNA通过促进大规模位点缺失诱导结构不稳定。Z-DNA参与c-MYC基因转录过程, c-MYC上调与位于启动子区域AluI限制性片段Z-DNA形成有关^[40]。Z-DNA序列在免疫球蛋白相关基因ETV6中富集, 与染色体易位相关^[30]。

B细胞前溶血性淋巴瘤母细胞性白血病具有21号染色体扩增(iAMP21)的特征, 通过断裂-融合-桥(BFB)机制在染色体5.1-24 Mb区域产生, 其中包括RUNX1和PDE9A基因。Sinclair等^[41]发现iAMP21患者的断裂点主要位于PDE9A内含子1, 在5 400 bp处可形成Z-DNA的CA重复序列(Z-DNA-forming regions, ZDR), 表明ZDR与iAMP21断裂点存在关联, 参与B细胞前溶血性淋巴瘤母细胞白血病的发生。Z-DNA与肿瘤间存在负性调节关系。在乳腺癌、肝癌、胃癌、神经系统肿瘤、骨肉瘤和前列腺癌等许多肿瘤组织中ADAM-12 mRNA水平升高, 表明ADAM是乳腺癌和前列腺癌进展的标志。Ray等^[42]将-1 600/+20 ADAM12-CAT(删除ADAM-12中+20和+350之间序列)及-1 600/+350 ADAM12-CAT构建体瞬时转染到HepG2(肝细胞)、BEAS-2B(肺上皮细胞), SW-156(肾上皮细胞), HTB-94(软骨细胞)和JEG-3(胎盘细胞)。转染-1 600/+ 20ADAM12-CAT构建体的细胞ADAM12表达增加3倍。提示ADAM-12中+20与+350间序列存在负调控元件(negative regulatory element, NRE), 缺失会导致CAT活性显著增加。另发现+100/+190元件的二核苷酸重复序列主要由CG和CA组成能形成左手Z-DNA。应用非Z-DNA序列取代该二核苷酸重复序列完全阻断报告基因的NRE功能。通过使用特异性识别Z-DNA结构的单克隆抗体Z22证明ADAM-12启动子包含Z-DNA形成序列(Z-DNA forming sequence, ZFS), 负调控正常细胞ADAM-12表达。MeCP2可与ZFS结合将NF1转录因子募集到相邻位点, 抑制ADAM-12表达, MeCP2水平降低, 证明Z-DNA与人类疾病相关^[30]。

4.2 DNA 构象多态性与肿瘤的进展

Brooks等^[43]发现一些致癌基因的启动子存在G-四链体结构或i-基序, 发挥转录调节因子作用, 影响肿瘤进展。PDGFR- β 核酸酶超敏元件(nuclease hypersensitivity element, NHE)是PDGFR- β 转录活性关键启动子调控元件, 其上游-166至-132碱基对区域内有1个富含GC区域, 由7个多鸟嘌呤/多胞

嘧啶片段组成, 通过重叠形成至少4个G-四链体或i-基序, 在PDGFR的转录抑制中起关键作用。G-四链体点突变可引起PDGFR- β 基因表达上调, 促进细胞增殖与运动迁移。i-基序抑制剂NSC309874能抑制神经母细胞瘤细胞系(SK-N-SH)PDGFR- β 表达, 与神经母细胞瘤的进展有关^[44]。

HRAS受2个相邻富含GC元素的HRAS-1和HRAS-2调控, 二者位于HRAS上游主要TSS, 可折叠成G-四链体结构。Kaiser等^[45]发现G-四链体抑制HRAS的转录。研究^[46]发现HRAS-1Y和HRAS-2Y在弱酸性条件下呈i-基序(iM构象)。i-基序和G-四链体在肿瘤进展中起负性调节作用。ATRX缺失突变是胶质瘤的特征, 具有串联重复和CpG岛位点广泛结合基因组, 这些串联重复和CpG岛位点基因座富含GC易于形成G-四链体, 引起基因组不稳定, 促进肿瘤进展^[47]。

4.3 DNA 构象多态性与肿瘤的靶向治疗

通过靶向非B结构选择性治疗癌症成为新的研究趋势^[48], 但目前靶向这些结构的研究尚不多见。

核糖体DNA(rDNA)在约90%肿瘤组织中过表达, rDNA富含GC, 可产生G-四链体形成序列(PQS)。Drygin等^[49]发现PQS可形成平行、反平行或混合构象G-四链体结构, 可与核仁蛋白形成复合物(核仁蛋白/G-四链体复合物), 加速rDNA转录。靶向核仁蛋白/rDNA G-四链体复合物以抑制癌细胞Pol I转录成为一种新的核仁靶向技术, 可选择性地破坏癌细胞增殖。CX-3543, 一种小分子氟喹诺酮衍生物, 可靶向破坏核仁蛋白/rDNA G-四链体复合物, 通过p53稳定诱导凋亡。

各种致癌基因的启动子元件中存在i-基序结构, 如c-MYC、BCL2、PDGFR- β 、VEGF和n-MYC等。i-基序结构是抗癌药物的靶点, 但高度特异性i-基序结构结合配体研究少见。PDGFR- β 启动子i-基序与苯甲酰胺相互作用下调基因转录。Shu等^[50]研究发现B19可以选择性地结合并稳定c-MYC启动子i-基序, 下调c-MYC转录与表达, 影响SiHa细胞(子宫颈癌细胞)增殖, 抑制SiHa细胞迁移, 诱导凋亡。

端粒DNA通过端粒酶再激活诱导DNA损伤, 促进肿瘤进展, 是治疗肿瘤的极佳靶标。端粒富含GC的DNA片段, 可形成G-四链体结构, 或通过小分子稳定端粒G-四链体, 抑制端粒酶活性^[43]。端粒他汀是已知最有效选择性G-四链体结合小分子, Shammas等^[51]研究发现端粒他汀可抑制ARD细胞(人多发性骨髓瘤细胞)和MM1S细胞(骨髓瘤细胞)>90%的端粒酶活性, 抑制细胞增殖,

诱导细胞死亡, 与端粒他汀稳定端粒G-四链体结构, 抑制端粒酶活性有关^[51-52]。提示通过配体结合非B-DNA结构, 影响基因表达, 抑制肿瘤生长, 可成为新的癌症治疗方向。

5 结语

越来越多的研究显示非B-DNA构象影响基因组的调控及不稳定性, 从而影响肿瘤的发生发展。开发能结合非B-DNA的靶向探针分子将进一步认识非B-DNA构象的内源功能, 为靶向治疗提供更多的数据。

参考文献

- Bacolla A, Wells RD. Non-B DNA conformations as determinants of mutagenesis and human disease[J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(4): 273-285.
- Mirkin SM. Discovery of alternative DNA structures: a heroic decade (1979-1989)[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 1064-1071.
- Yu Z, Schonhoft JD, Dhakal S, et al. ILPR G-quadruplexes formed in seconds demonstrate high mechanical stabilities[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(5): 1876-1882.
- Choi J, Majima T. Conformational changes of non-B DNA[J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(12): 5893-909.
- Del Mundo IMA, Cho EJ, Dalby KN, et al. A tunable assay for modulators of genome-destabilizing DNA structures[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(13): e73.
- Pandey S, Ogloblina AM, Belotserkovskii BP, et al. Transcription blockage by stable H-DNA analogs in vitro[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(14): 6994-7004.
- Travers A, Muskhelishvili G. DNA structure and function[J]. *FEBS J*, 2015, 282(12): 2279-2295.
- Satange R, Chang CK, Hou MHA, et al. Survey of recent unusual high-resolution DNA structures provoked by mismatches, repeats and ligand binding[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(13): 6416-6434.
- Ciullo M, Debily MA, Rozier L, et al. Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I[J]. *Hum Mol Genet*. 2002, 11(23):2887-94.
- Zhao J, Bacolla A, Wang G, et al. non-B DNA structure induced genetic instability and evolution[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(1): 43-62.
- Schmidt MHM, Pearson CE. Disease-associated repeat instability and mismatch repair[J]. *DNA repair*, 2016, 38: 117-126.
- Javadekar SM, Raghavan SC. Department of biochemistry snaps and mends: DNA breaks and chromosomal translocations[J]. *FEBS J*, 2015, 282(14): 2627-2645.
- Dere R, Napierala M, Ranum LP, et al. Hairpin structure-forming propensity of the (CCTG.CAGG) tetranucleotide repeats contributes to the genetic instability associated with myotonic dystrophy type 2[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(40): 41715-4126.
- Jain A, Wang G, Vasquez KM. DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential[J]. *Biol Chem*, 2008, 90(8): 1117-1130.
- Helma R, Bažantová P, Petr M, et al. p53 binds preferentially to non-B DNA structures formed by the pyrimidine-rich strands of GAA-TTC trinucleotide repeats associated with Friedreich's ataxia[J]. *Molecules*, 2019, 24(11): E2078.
- Vetcher A, Napierala M, Wells RD, et al. Sticky DNA: effect of the polypurine.polypyrimidine sequence[J]. *Biol Chem*, 2002, 277(42): 39228-39234.
- Monteiro AR, Ramos CIV, Fateixa S, et al. Hybrids based on graphene oxide and porphyrin as tools for detection and stabilization of DNA G-quadruplexe[J]. *ACS Omega*, 2018, 3(9): 11184-11191.
- Yu Z, Mao H. Non-B DNA structures show diverse conformations and complex transition kinetics comparable to RNA or proteins--a perspective from mechanical unfolding and refolding experiments[J]. *Chem Rec*, 2013, 13(1): 102-116.
- London TB, Barber LJ, Mosedale G, et al. FANCD1 is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts[J]. *Biol Chem*, 2008, 283(52): 36132-36139.
- Lemmens B, van Schendel R, Tijsterman M. Mutagenic consequences of a single G-quadruplex demonstrate mitotic inheritance of DNA replication fork barriers[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8909.
- Valton AL, Prioleau MN. G-quadruplexes in DNA replication: a problem or a necessity?[J]. *Trends Genet*, 2016, 32(11): 697-706.
- Asamitsu S, Takeuchi M, Ikenoshita S, et al. Perspectives for applying G-quadruplex structures in neurobiology and neuropharmacology[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): E2884.
- Law MJ, Lower KM, Voon HP, et al. ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner[J]. *Cell*, 2010, 143: 367-378.
- Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, et al. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease[J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 195-200.
- Day HA, Pavlou P, Waller ZA. i-Motif DNA: structure, stability and targeting with ligands[J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(16): 4407-4418.
- Takahashi S, Brazier JA, Sugimoto N. Topological impact of noncanonical DNA structures on Klenow fragment of DNA polymerase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(36): 9605-9610.
- Kovanda A, Zalar M, Šket P, et al. Anti-sense DNA d(GGCCCC)n expansions in C9ORF72 form i-motifs and protonated hairpins[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17944.

28. Khan N, Kolimi N, Rathinavelan T. Twisting right to left: A mismatch in a CAG trinucleotide repeat overexpansion provokes left-handed Z-DNA conformation[J]. *PLoS Comput Biol*, 2015, 11(4): e1004162.
29. Renčiuk D, Kypr J, Vorlíčková M. CGG repeats associated with fragile X chromosome form left-handed Z-DNA structure[J]. *Biopolymers*, 2011, 95(3): 174-181.
30. Ravichandran S, Subramani VK, Kim KK. Z-DNA in the genome: from structure to disease[J]. *Biophys Rev*, 2019, 11(3): 383-387.
31. Guiblet WM, Cremona MA, Cechova M, et al. Long-read sequencing technology indicates genome-wide effects of non-B DNA on polymerization speed and error rate[J]. *Genome Res*, 2018, 28(12): 1767-1778.
32. Benabou S, Ruckebusch C, Sliwa M, et al. Study of conformational transitions of i-motif DNA using time-resolved fluorescence and multivariate analysis methods[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(13): 6590-6605.
33. Cer RZ, Bruce KH, Donohue DE, et al. Searching for non-B DNA-forming motifs using nBMST (non-B DNA Motif Search Tool)[J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2012, Chapter 18: Unit-18.7.22.
34. Agarwal S, Jangir DK, Mehrotra R, et al. A structural insight into major groove directed binding of nitrosourea derivative nimustine with DNA: a spectroscopic study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104115.
35. Verma SP, Das P. Novel splicing in IGFN1 intron 15 and role of stable G-quadruplex in the regulation of splicing in renal cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205660.
36. Bacolla A, Tainer JA, Vasquez KM, et al. Translocation and deletion breakpoints in cancer genomes are associated with potential non-B DNA-forming sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(12): 5673-5688.
37. Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J, et al. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(20): 7143-7151.
38. Umek T, Sollander K, Bergquist H, et al. Oligonucleotide binding to non-B-DNA in MYC[J]. *Molecules*, 2019, 24(5): 1000.
39. Wang G, Vasquez KM. Naturally occurring H-DNA-forming sequences are mutagenic in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(37): 13448-13453.
40. Vongsutilers V, Gannett PM. C8-Guanine modifications: effect on Z-DNA formation and its role in cancer[J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16(13): 2198-2209.
41. Sinclair PB, Parker H, AnQR, et al. Analysis of a breakpoint cluster reveals insight into the mechanism of intrachromosomal amplification in a lymphoid malignancy[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(13): 2591-2602.
42. Ray BK, Dhar S, Shakya A, et al. Z-DNA-forming silencer in the first exon regulates human ADAM-12 gene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(1): 103-108.
43. Brooks TA, Hurley LH. The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(12): 849-861.
44. Brown RV, Wang T, Chappeta VR, et al. The consequences of overlapping G-quadruplexes and i-Motifs in the platelet-derived growth factor receptor β core promoter nucleic hypersensitive element can explain the unexpected effects of mutations and provide opportunities for selective targeting of both structures by small molecules to downregulate gene expression[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(22): 7456-7475.
45. Kaiser CE, Van Ert NA, Agrawal P, et al. Insight into the complexity of the i-Motif and G-Quadruplex DNA structures formed in the KRAS promoter and subsequent drug-induced gene repression[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(25): 8522-8536.
46. Miglietta G, Cogoi S, Pedersen EB, et al. GC-elements controlling HRAS transcription form i-motif structures unfolded by heterogeneous ribonucleoprotein particle A1[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18097.
47. Wang Y, Yang J, Wild AT, et al. G-quadruplex DNA drives genomic instability and represents a targetable molecular abnormality in ATRX-deficient malignant glioma[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 943.
48. Cimino-Reale G, Zaffaroni N, Folini M. Emerging role of G-quadruplex DNA as target in anticancer therapy[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2016, 22(44): 6612-6624.
49. Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S. Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7653-7661.
50. Shu B, Cao J, Kuang G, et al. Syntheses and evaluation of new acridone derivatives for selective binding of oncogene c-myc promoter i-motifs in gene transcriptional regulation[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54(16): 2036-2039.
51. Shammas MA, Shmookler Reis RJ, Li C, et al. Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 770-776.
52. Shalaby T, Fiaschetti G, Nagasawa K, et al. G-quadruplexes as potential therapeutic targets for embryonal tumors[J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 12500-12537.

本文引用：苏晓丽，张声. DNA构象多态性对肿瘤生物学行为影响的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(2): 415-422. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.02.025

Cite this article as: SU Xiaoli, ZHANG Sheng. Research progress in the effects of DNA conformation polymorphism on tumor biological behavior[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(2): 415-422. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.02.025