وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه
گاوازنگ – زنجان

بررسی برهم‌کنش اکتینومایسین D با DNA چهاررشته‌ای غنی از گوانین توسط روش‌های آزمایشگاهی و مدل‌سازی مولکولی

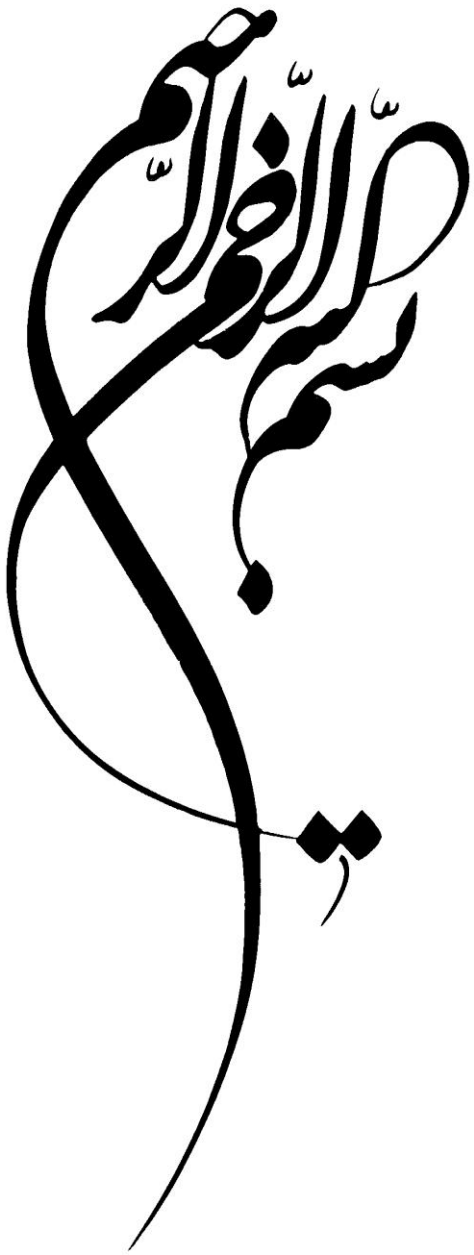
پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد

ژیلا نیک‌نژاد

اساتید راهنما: دکتر لیلا حسنی

دکتر داوود نوروزی

بهمن ۱۳۹۲


بسم الله الرحمن الرحیم

تقدیم به

پدر و مادر عزیز و مهربانم

به خاطر زحمات بی‌دریغشان

و

برادر و خواهر عزیزم

که وجودشان مایه آرامش من است.

سپاس خدایی که آفرید جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را.

از پدر و مادر عزیزم به خاطر همه‌ی تلاش‌های محبت آمیزی که در تمامی دوران زندگی‌ام انجام داده اند، تشکر می‌کنم.

با سپاس فراوان از راهنمائی‌ها و زحمات استاد محترم و گرانقدر دکتر لیلا حسنی که از ابتدای راه و در طی انجام این پروژه، با راهنمائی‌های خود مرا در نگارش آن یاری نمودند و همچنین قدردانی و تقدیر از استاد محترم، دکتر داوود نوروزی که با راهنمائیشان، یاری‌ام نمودند.

از دکتر سعید عمادی، دکتر جعفریان و دکتر هادی، اساتید محترم داور و همچنین از دکتر ملازاده و محمدی‌نژاد بخاطر راهنمائیشان کمال تشکر را دارم.

و در پایان از دوستان عزیزم و سایر کسانی که در تدوین این پروژه مرا یاری نمودند، متشکرم.

چکیده

ژن c-Myc نقش مهمی در تنظیم رشد و تکثیر سلولی ایفا می‌کند و بیان بیش از حد این ژن در گستره وسیعی از سرطان‌های انسانی دیده شده است. حدود ۹۰٪ رونویسی ژن c-Myc از طریق یک توالی ۲۷ نوکلئوتیدی غنی از گوانین بسیار حساس به نوکلئاز بنام nuclease-hypersensitive element III (NHE III) کنترل می‌شود که این توالی قادر به تشکیل ساختار G-quadruplex تحت شرایط فیزیولوژیک است. بنابراین DNA ژن c-Myc یک هدف مناسب برای طراحی دارو به خصوص برای شیمی درمانی سرطان محسوب می‌شود. در این مطالعه، میان‌کنش اکتینومایسین D (ActD) با ساختار چهاررشته‌ای با روش دینامیک مولکولی مطالعه شده است. همچنین بر هم‌کنش این دارو با رشته ۲۷ نوکلئوتیدی غنی از گوانین (G/c-Myc) و مخلوط این توالی با توالی مکمل خود با غلظت مولی یکسان (GC/c-Myc) بعلاوه الیگونوکلئوتید غنی از سیتوزین مکمل این توالی (C/c-Myc) با روش‌های طیف سنجی بررسی شده است. نتایج دینامیک مولکولی نشان داد که اتصال ActD به چهاررشته‌ای از نوع انباشتگی روی بخش‌های انتهایی است و همچنین ActD شعاع ژیراسیون ساختار چهاررشته‌ای را افزایش داده است. نتایج حاصل از مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی برای الیگونوکلئوتیدهای غنی از گوانین و سیتوزین در غلظت ۱۵۰ میلی مولار KCl و ۷/۲ pH طیف‌هایی مطابق با طیف DNA چهاررشته‌ای موازی برای G/c-Myc و i-motif برای C/c-Myc نشان داد. همچنین طیف دورنگ‌نمایی دورانی نشان داد ساختار غالب GC/c-Myc در حضور یون K^+ دو رشته‌ای است. بر اساس طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی مشخص شد که ActD باعث تغییر نوع ساختار DNA نشده و صرفاً فشردگی ساختار آن را تغییر می‌دهد. مطالعات طیف بینی فلورسانس نشان داد که نشر ActD بعد از اضافه شدن سه نوع DNA افزایش پیدا می‌کند که مبین وارد شدن ActD به نقاط غیرقطبی می‌باشد. بر طبق طیف بینی جذبی نتیجه گرفته شد که احتمالاً نحوه اتصال غالب کمپلکس به DNA اتصال خارجی و انباشتگی روی بخش‌های انتهایی است.

کلمات کلیدی: اکتینومایسین D، c-Myc، DNA چهاررشته‌ای، دینامیک مولکولی، طیف‌سنجی، برهم‌کنش

فهرست

عنوان شماره صفحه

فهرست مطالب ..... ب
فهرست شکل‌ها ..... ج
فهرست جدول‌ها ..... خ

فصل اول: مقدمه

۱.۱ DNA ۱
۱.۲ DNA چهاررشته‌ای ۲
۱.۲.۱ نقش یون در چهاررشته‌ای ۳
۲.۲.۱ پایداری چهاررشته‌ای ۳
۳.۲.۱ جهت‌گیری چهاررشته‌ای ۴
۴.۲.۱ تنوع ساختاری چهاررشته‌ای ۶
۵.۲.۱ لوپ‌ها در G_4 ..... ۷
۶.۲.۱ حضور چهاررشته‌ای در پروموتور ۸
۱.۶.۲.۱ چهاررشته‌ای در c-Myc ۱۰
۲.۶.۲.۱ انواع مختلف چهاررشته‌ای گوانین در پروموتورها ۱۰
۳.۶.۲.۱ نقش چهاررشته‌ای‌های پروموتور در سرطان ۱۲
۷.۲.۱ حضور چهاررشته‌ای در تلومر ۱۳
۸.۲.۱ نقش چهاررشته‌ای در همانندسازی و رونویسی ۱۵
۹.۲.۱ نقش چهاررشته‌ای در نوترکیبی ۱۶
۳.۱ اتصال لیگاند به DNA ۱۷
۱.۳.۱ اتصال لیگاند به چهاررشته‌ای ۱۷

۴.۱ i –motif ۱۹
۱.۴.۱ انواع i –motif ۱۹
۵.۱ اکتینومایسین D ۲۱
۱.۵.۱ تاریخچه‌ی مطالعه و کاربرد اکتینومایسین ۲۱
۶.۱ هدف از مطالعه‌ی حاضر ۲۴
۷.۱ روش‌های استفاده شده ۲۵
۱.۷.۱ دینامیک مولکولی ۲۵
۲.۷.۱ طیف‌بینی جذبی مرئی- فرابنفش ۲۵
۳.۷.۱ طیف‌بینی فلورسانس ۲۶
۴.۷.۱ دورنگ‌نمایی دورانی(CD) ۲۶

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۱.۲ مطالعات شبیه‌سازی مولکولی ۲۸
۱.۱.۲ مفاهیم اولیه AMBER ۲۸
۲.۱.۲ مراحل شبیه‌سازی ۲۹
۲.۲ مطالعات تجربی ۳۱
۱.۲.۲ دستگاه‌ها ۳۱
۲.۲.۲ مواد زیستی و شیمیایی ۳۲
۳.۲.۲ روش‌ها ۳۳
۱.۳.۲.۲ تهیه بافر ۳۳
۲.۳.۲.۲ فولد کردن اولیگونوکلئوتیدها ۳۳
۳.۳.۲.۲ آماده‌سازی و تعیین غلظت ActD ۳۴
۴.۳.۲.۲ طیف‌بینی جذبی مرئی-فرابنفش ۳۴
۵.۳.۲.۲ طیف‌بینی فلورسانس ۳۴
۶.۳.۲.۲ روش دورنگ‌نمایی دورانی (CD) ۳۵

فصل سوم: نتایج

۱.۳ نتایج دینامیک مولکولی برهم‌کنش ActD با DNA چهاررشته‌ای ۳۷

۱.۱.۳ نتایج حاصل از RMSD ۳۹

۲.۱.۳ مکان میان‌کنش ActD به G_4 ۴۰

۳.۱.۳ نتایج حاصل از RMSF ۴۲

۴.۱.۳ فاصله‌ی ActD با چهاررشته‌ای ۴۴

۵.۱.۳ نتایج حاصل از شعاع ژیراسیون ۴۶

۲.۳ نتایج بخش تجربی ۴۷

۱.۲.۳ بررسی ساختار DNA با روش دورنگ نمایی دورانی ۴۷

۱.۱.۲.۳ بررسی اثر ActD بر ساختار DNA با روش دورنگ‌نمایی دورانی ۵۰

۲.۲.۳ نتایج طیف‌بینی جذبی DNA– ActD ۵۲

۱.۲.۲.۳ طیف جذبی DNA– ActD ۵۳

۲.۲.۲.۳ نتایج طیف جذبی ActD در حضور DNA ۵۳

۳.۲.۲.۳ نمودار اسکاچارد ۵۷

۳.۲.۳ بررسی طیف بینی فلوروسانس ۶۰

۳.۳ نتیجه‌گیری کلی ۶۷

پیشنهادات ۶۹

پیوست ۷۰

الف.۱دینامیک‌مولکولی ۷۰

الف.۱.۱ تعریف میدان نیرو ۷۰

الف.۱.۱.۱ انرژی در میدان نیرو ۷۰

الف.۲ شبیه‌سازی با AMBER ۷۲

الف.۱.۲ فایل‌های مورد نیاز AMBER ۷۲

الف.۲.۲ محیط‌های شبیه سازی ۷۲

الف.۳.۲ مراحل آماده‌سازی ۷۳

الف.۱.۳.۲ ساخت فایل‌های اکتینومایسین D ۷۳
الف.۲.۳.۲ساخت فایل‌های کمپلکس ActD و DNA چهاررشته‌ای ۷۵
الف.۴.۲ کمینه‌سازی و دینامیک مولکولی ۷۷
الف.۱.۴.۲ ساخت فایل‌های mdin ورودی ۷۸
الف.۲.۴.۲ شرایط مرزی متناوبی ۷۹
الف.۳.۴.۲ مراحل کمینه سازی ۸۰
الف.۴.۴.۲ اجرا کردن دینامیک مولکولی در explicit ۸۲
الف.۳ آنالیز خروجی ۸۶
مراجع ۸۷
واژه‌نامه انگلیسی به فارسی ۹۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: ساختار تشکیل‌دهندهٔ اسیدهای نوکلئیک چهاررشته‌ای (تترادهای گوانینی) ۲
شکل ۱-۲: برهم‌کنش یون با اتم‌های O_6 گوانین ۳
شکل ۱-۳: چهار ساختار G_4 ..... ۶
شکل ۱-۴: ساختارهای چهاررشته‌ای ۷
شکل ۱-۵: انواع حلقه‌ها ۸
شکل ۱-۶: تشکیل G_4 در پروموتور می‌تواند سطح و ماهیت رونویسی ژن را تغییر دهد ۹
شکل ۱-۷: ساختار پروموتور ژن c-Myc ۱۰
شکل ۱-۸: دسته‌های متفاوت از چهاررشته‌ای در پروموتور یوکاریوت‌ها ۱۱
شکل ۱-۹: شش نشانه از سرطان که با تشکیل شدن چهاررشته‌ای در ناحیه‌ی پروموتور ژن‌ها همراه بوده است ۱۳
شکل ۱-۱۰: انتهای یک کروموزوم خطی ۱۴
شکل ۱-۱۱: توالی غنی از گوانین ۱۴
شکل ۱-۱۲: توقف همانندسازی توسط چهاررشته‌ای. ۱۶
شکل ۱-۱۳: انواع روش‌های میان‌کنش بین لیگاند و چهاررشته‌ای ۱۸
شکل ۱-۱۴: ساختار i –motif ۱۹

شکل ۱-۱۵: توالی و الگوی فولد شدن i –motif در دو گروه از پروموتور یوکاریوت‌ها..... ۲۰
شکل ۱-۱۶: ساختار ActD..... ۲۱
شکل ۱-۱۷: اجزای دایره‌ای راست‌گرد(R) و چپ‌گرد(L) نور قطبی شده‌ی صفحه‌ایی ۲۷
شکل۳-۱: منحنی تغییرات انرژی بر حسب زمان. ۳۷
شکل۳-۲: منحنی تغییرات فشار بر حسب زمان می‌باشد. ۳۸
شکل ۳-۳: منحنی تغییرات دما بر حسب زمان..... ۳۸
شکل۳-۴: نمودار RMSD بر حسب زمان. ۴۰
شکل ۳-۵: الف-ساختارActD ب-موقعیت گوانین‌ها در چهاررشته‌ای c-Myc..... ۴۱
شکل۳-۶: موقعیت ActD نسبت به DNA چهاررشته‌ای قبل از شروع شبیه‌سازی **و** بعد از شبیه‌سازی.... ۴۱
شکل ۳-۷: میان‌کنش ActD با نقاط غیرقطبی چهاررشته‌ای..... ۴۲
شکل ۳-۸: نمودار RMSF ساختاری اسکلت چهاررشته‌ای در حضور و عدم حضورActD..... ۴۳
شکل۳-۹: فاصله‌ی بین گروه متیل حلقه‌ی فنوکسازین ActD با اتم N_3 گوانین G_{22}..... ۴۵
شکل ۳-۱۰: فاصله‌ی بین ترئونین حلقه لاکتونی ActD با اتم N_3 گوانین G_{18}..... ۴۵
شکل ۳-۱۱: فاصله‌ی بین ترئونین حلقه لاکتونی ActD با اتم N_3 گوانین G_{13}..... ۴۶
شکل ۳-۱۲: نمودار شعاع ژیراسیون در حضور و عدم حضور ActD..... ۴۷
شکل۳-۱۴: طیف دورنگ‌نمایی دورانی GC/c-Myc و GC/c-Myc در حضور ActD ۵۱
شکل۳-۱۵: طیف دورنگ‌نمایی دورانی G/c-c-Myc و G/c- Myc در حضور ActD ۵۱
شکل۳-۱۶: طیف دورنگ‌نمایی دورانی C/c-Myc و C/c-Myc در حضور ActD ۵۲
شکل ۳-۱۷: طیف جذبی ActD با غلظت ۲۰ میکرومولار..... ۵۳
شکل ۳-۱۸: طیف جذبی تیتراسیون ActD با غلظت اولیه ۲۰ میکرومولار با دو رشته‌ایGC/c-Myc ... ۵۴
شکل ۳-۱۹: طیف جذبی تیتراسیون ActD با غلظت اولیه ۲۰ میکرومولار با دو رشته‌ای G/c-Myc..... ۵۴
شکل ۳-۲۰: طیف جذبی تیتراسیون ActD با غلظت اولیه ۲۰ میکرومولار با دو رشته‌ای C/c-Myc ۵۵
شکل ۳-۲۱: نمودار اسکاچارد مربوط به ActD با GC/c-c-Myc..... ۵۸
شکل ۳-۲۲: نمودار اسکاچارد مربوط به ActD با G/c-c-Myc ۵۸
شکل ۳-۲۳: نمودار اسکاچارد مربوط به ActD با C/c-c-Myc..... ۵۹
شکل ۳-۲۴: طیف نشری تیتراسیون ActD با غلظت اولیه ۲ میکرومولار، با GC/c-c-Myc ۶۰
شکل ۳-۲۵ طیف نشری تیتراسیون ActD با غلظت اولیه ۲ میکرومولار، با G/c-c-Myc ۶۱
شکل ۳-۲۶: طیف نشری تیتراسیون ActD با غلظت اولیه ۲ میکرومولار، با C/c-c-Myc ۶۱

شکل ۳-۲۷ شدت نشر در ActD در طول موج ۴۷۰ nm بر اثر افزایش میزان GC/c-Myc ، C/c-Myc و G/c-Myc ۶۲
شکل ۳-۲۸ : نمودار double reciprocal اکتینومایسینD با GC/c-Myc، G/c-Myc و C/c-c-Myc ۶۵
شکل الف.۱: شرایط مرزی متناوب ۸۰

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱: لیست دستگاه‌ها ۳۱
جدول ۲-۲: لیست مواد آزمایشگاهی ۳۲
جدول ۳-۱: درصدهای هایپوکرومیسیتی و مقادیر شیفت قرمز مشاهده شده طیف‌های جذبی مرئی-فرابنفش ActD در حضور GC/c-Myc، C/c-Myc و G/c-Myc ۵۷
جدول ۳-۲: درصدهای افزایش نشر و مقادیر شیفت آبی مشاهده شده در طیف‌های جذبی مرئی فرابنفشActD در حضور GC/c-Myc، C/c-Myc و G/c-Myc ۶۳
جدول ۳-۳: ثابت اتصال طیف نشری فلوروسانس ActD با GC/c-Myc، C/c-Myc و G/c-Myc ۶۶

فصل اول

مقدمه

در تحقیق حاضر میان‌کنش اکتینومایسین D[1] با DNA چهاررشته‌ای توسط روش‌های طیف بینی و مدل-سازی بررسی شده است. در فصل مقدمه توضیحاتی در مورد ساختار DNA چهاررشته‌ای و اهمیت زیستی آن و همچنین اکتینومایسین D ارائه شده است. علاوه بر این بخشی از مقدمه به توضیح در مورد روش‌های استفاده شده در این تحقیق اختصاص یافته است.

۱.۱ DNA

دزوکسی‌ریبونوکلئیک‌اسید[1] DNA یک پلی‌مر بلند متشکل از واحدهای تکراری نوکلئوتید است که هر نوکلئوتید شامل یک قند ۵ کربنه به نام ۲-داکسی‌ریبوز[2] ، باز و گروه فسفات است [۱، ۲]. همان طور که ابتدا توسط واتسون و کریک کشف شد، ساختار DNA همه‌ی گونه‌ها از دو زنجیره‌ی مارپیچی تشکیل شده که اطراف یک محور پیچیده شده‌اند [۲-۳]. بعد از این‌که واتسون و کریک مدل دو رشته‌ای مارپیچی را پیشنهاد کردند، تحقیقات گسترده‌تری برای تعیین تصویر کامل‌تری از ساختار DNA درون سلول انجام شد. بخش زیادی از DNA بصورت دو رشته‌ای مارپیچی نوع B است که بین دو باز مکمل زنجیره‌ها، مدل واتسون-کریکی برقرار است؛ اما دو رشته‌ای DNA بصورت گذرا و ناپایدار توانایی تشکیل ساختارهای ثانویه DNA به غیر از فرم B شامل DNA چپ‌گرد (Z-DNA)، تریپلکس (HDNA)، DNA صلیبی شکل، چهاررشته‌ای[3] و i –motif دارند. پلی‌مورفیسم ساختارهای

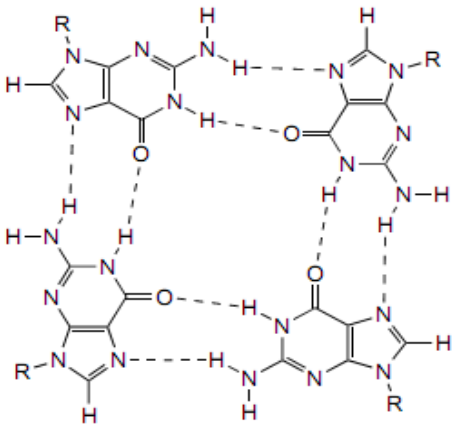
[1] Actinomycin D

DNA توسط توالی DNA، توپولوژی به‌خاطر سوپرکویل DNA، یون‌ها، پروتئین‌های متصل شونده به DNA وغیره تعیین می‌شود [۵].

۲.۱ DNA چهاررشته‌ای

چهاررشته‌ای ساختار ثانویه‌ی DNA است که شامل چندین تتراد گوانین انباشته شده روی هم می‌باشد. پیوند هیدروژنی هوگستین[۴] بین N_2 و N_7 و همچنین O_6 و N_1 بازهای گوانین برقرار می‌شود که چهار گوانین را به هم متصل می‌کند تا تشکیل صفحه G- تتراد دهد (شکل ۱-۱) [۴]. درگیر شدن N_7 از گوانین در جفت بازهای هوگستین صفحه‌ی تتراد گوانینی، جایگاه را از تغییرات شیمیایی نظیر متیلاسیون توسط دی متیل سولفات محافظت می‌کند [۵-۶].

توالی‌هایی که به صورت d(GGG….GGG….GGG….GGG….GGG) هستند، پتانسیل تشکیل ساختار چهاررشته‌ای دارند. منظور از …. حلقه‌هایی با طول ۱-۷ است. حلقه‌های کوچک از نظر دمایی پایدارتر از حلقه‌های بزرگ‌تر هستند. چهاررشته‌ای برخلاف DNA دورشته‌ای که دارای دو شیار بزرگ و کوچک است، چهار شیار دارد که اندازهٔ آنها به هندسه‌ی G_4 و نوع شیارها بستگی‌دارد [۵-۶].

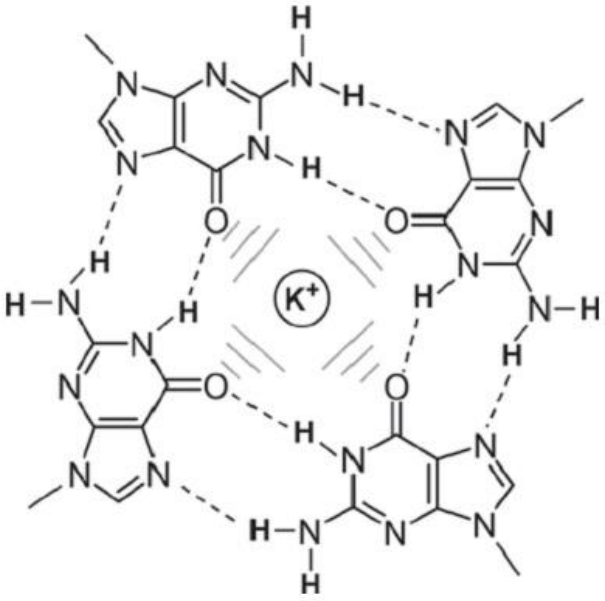


شکل ۱-۱: ساختار تشکیل‌دهنده‌ی اسیدهای نوکلئیک چهاررشته‌ای (تترادهای گوانینی) [۶].

[1] Deoxyribonucleic acid
[2] 2-Deoxyribose
[3] G-quadruplex
[4] Hoogsteen hydrogen bond

۱.۲.۱ نقش یون در چهاررشته‌ای

تشکیل چهاررشته‌ای نیاز به کاتیون تک ظرفیتی[1] دارد که به طور اختصاصی‌تر با K^+ و با میزان کمتر با NH_4^+ و Na^+ پایدار می‌شود. این یون‌ها با جفت‌های آزاد اتم‌های O_6 گوانین در هسته‌ی مرکزی برهم‌کنش الکترواستاتیک برقرار می‌کنند (شکل ۱-۲) [۶-۷].



شکل ۱-۲: برهم‌کنش یون با اتم‌های O_6 گوانین [۸].

۲.۲.۱ پایداری چهاررشته‌ای

در DNA دورشته‌ای، بازهای آدنین با تیمین و سیتوزین با گوانین به ترتیب توسط دو و سه پیوند هیدروژنی جفت می‌شوند. جفت بازهای استاندارد AT و CG پایداری متفاوتی دارند. جفت باز CG پایدارتر است که به دلیل به اشتراک گذاشتن سه پیوند هیدروژنی بین دو باز است که به‌طور میانگین، ۱/۵ پیوند به ازای هر باز وجود دارد، در حالی‌که جفت باز AT دو پیوند هیدروژنی دارد که به‌طور میانگین یک پیوند به ازای هر باز وجود دارد. شبکه‌ی پیوند هیدروژنی ساختار چهاررشته‌ای دارای

[1] Monovalent

هشت پیوند هیدروژنی بین چهار باز می‌باشد که به طور میانگین دو پیوند به ازای هر باز وجود دارد و نشان می‌دهد که ساختار چهاررشته‌ای، پایدارتر از DNA دو رشته‌ای غنی از GC است [۵-۶].

۳.۲.۱ جهت‌گیری چهاررشته‌ای

رشته‌های قند- فسفات که هسته‌ی تترادها را تشکیل می‌دهند، می‌توانند جهت‌گیری‌های مختلفی داشته باشند. به‌علاوه، جهت‌گیری‌های رشته از نظر هندسی به پیکربندی[1] گلیکوزیدی گوانین وابسته است. هرگوانین در ساختارهای چهاررشته‌ای، یک پیکربندی آنتی[2] یا سین [3]را بر اساس زاویه‌های گلیکوزیدی[4] ایجاد می‌کند و باعث تشکیل دو پیوند هیدروژنی N_1 - O_6 و N_2 - N_7 می‌شود.

براساس جهت‌گیری رشته، دو نوع چهاررشته‌ای مشخص می‌شود:

۱- چهاررشته‌ای موازی[5]: دارای چهاررشته است که همه‌ی آنها جهت‌گیری یکسانی دارند. در این چهاررشته‌ای، زاویه‌های گلیکوزیدی گوانین پیکربندی آنتی دارند و همه‌ی شیارهای قند- فسفات با هم برابر است.

۲- چهاررشته‌ای موازی ناهمسو[6]: دارای حداقل یک G-tract است که به صورت موازی ناهمسو با بقیه قرار دارد. چهاررشته‌ای موازی ناهمسو، هر دو پیکربندی آنتی و سین را دارد و در نتیجه جهت‌گیری ستون قند- فسفات تغییر کرده و شیارهایی با اندازه‌های متفاوت ایجاد می شود.

در مجموع چهار جهت‌گیری در ساختار چهاررشته‌ای وجود دارد:

۱- چهاررشته در یک جهت یکسان جهت‌یابی می‌کنند و زاویه‌های گلیکوزیدی به صورت آنتی-آنتی-آنتی-آنتی هستند.

۲- سه رشته در یک جهت و چهارمین رشته در جهت مخالف قرار می‌گیرد. زاویه‌های گلیکوزیدی به صورت آنتی-آنتی-آنتی- سین یا آنتی- سین- سین- سین هستند.

۳- دو زنجیره مجاور در یک جهت و دو زنجیره مقابل در جهت مخالف قرار می‌گیرند که زاویه‌های گلیکوزیدی آن به صورت سین- سین- آنتی- آنتی می‌باشند.

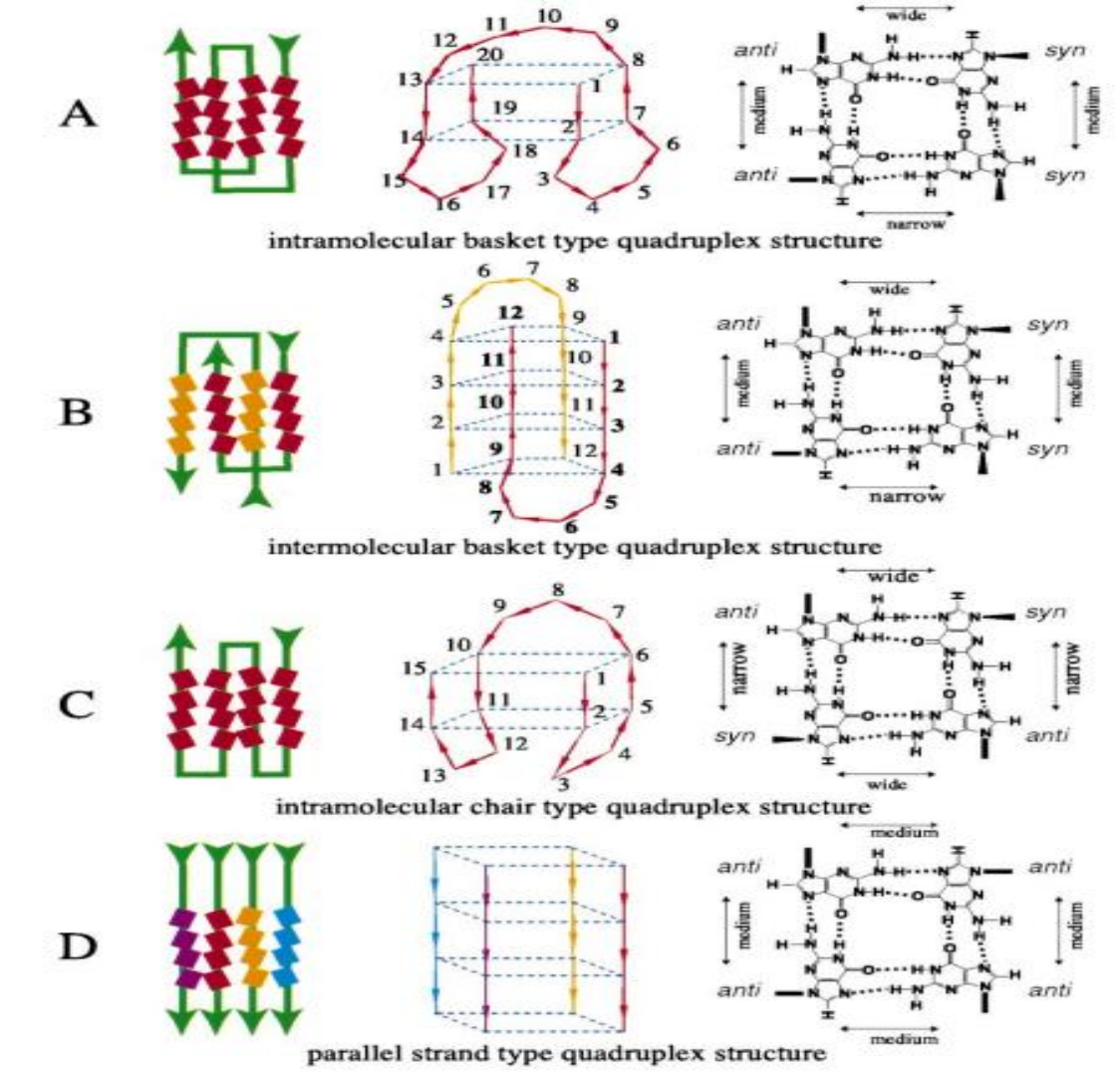
---

[1] Conformation
[2] Anti
[3] Syn
[4] Glycosidic angle
[5] Parallel
[6] Anti-parallel

۴- زنجیره‌های همسایه موازی ناهمسو هم می‌باشند که زاویه‌های گلیکوزیدی به صورت سین- آنتی- سین- آنتی هستند.

ساختارهای چهاررشته‌ای پتانسیل الکترواستاتیکی و شکل‌های متفاوتی دارند؛ برای مثال همان‌طور که در شکل ۱-۳ نشان داده شده است ساختار نوع صندلی[1] به صورت سین-آنتی- سین-آنتی است که دو شیار باریک و دو شیار پهن دارد. در ساختار سبدی[2] شکل گوانین‌ها در تترادها دارای زاویه‌های گلیکوزیدی سین- سین-آنتی-آنتی می‌باشند ویک شیار باریک، یک شیار پهن و دو شیار متوسط دارند. تمام شیارهای ساختار زنجیره موازی متوسط است. پتانسیل الکترواستاتیک شیارهای باریک، قوی است و جایگاه اتصال برای کاتیون‌ها و پروتئین‌ها فراهم می‌کنند [۹-۱۰].

[1] Chair
[2] Bascket



شکل ۱-۳: چهار ساختار G_4 A-ساختار چهاررشته‌ای نوع سبد درون مولکولی B-ساختار چهاررشته‌ای نوع سبد بین مولکولی C-ساختار چهاررشته‌ای نوع صندلی درون مولکولی D-ساختار چهاررشته‌ای نوع موازی [۱۰].

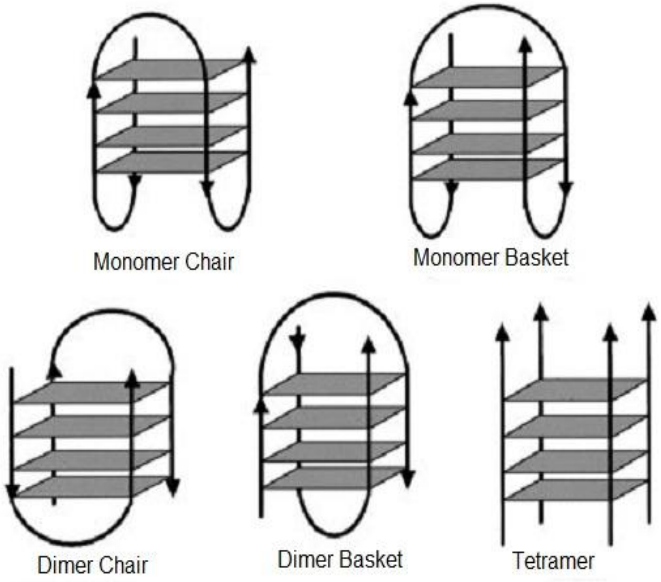
۴.۲.۱ تنوع ساختاری چهاررشته‌ای

ساختارهای چهاررشته‌ای از طریق فولد شدن فقط یک زنجیره، گاه دو یا چهار زنجیره DNA غنی از گوانین تشکیل می‌شوند (شکل ۱-۴). بر این اساس G_4 ها به سه دسته عمده تقسیم می‌شوند:

۱. چهارمولکولی[1]: از چهار رشته‌ی جدا از هم که با یکدیگر در ارتباط هستند، تشکیل شده و هر زنجیره حداقل یک G-tract دارد.

۲. دومولکولی[2]: از دو رشته تشکیل شده که هر کدام به طور معمول از دو G-tract تشکیل شده است، دسته ۱ و ۲ را G_4 بین‌مولکولی[3] نیز می‌گویند.

۳. تک‌مولکولی[4]: از یک رشته تشکیل شده و معمولاً چهار G-tract متوالی دارد، به این دسته G_4 درون‌مولکولی[5] نیز گفته می‌شود [۹].



شکل ۱-۴: ساختارهای چهاررشته‌ای از طریق فولد شدن فقط یک زنجیره، گاه دو یا چهار زنجیره DNA غنی از گوانین تشکیل می‌شوند [۱۱].

۵.۲.۱ لوپ‌ها در G_4

لوپ‌ها در چهاررشته‌ای، صفحات تتراد را به‌هم متصل نگه می‌دارند. همان‌طور که در شکل ۱-۵ مشاهده می‌شود لوپ‌ها به چهار دسته تقسیم می‌شوند که بر اساس اندازه و توالی از هم متفاوت اند:

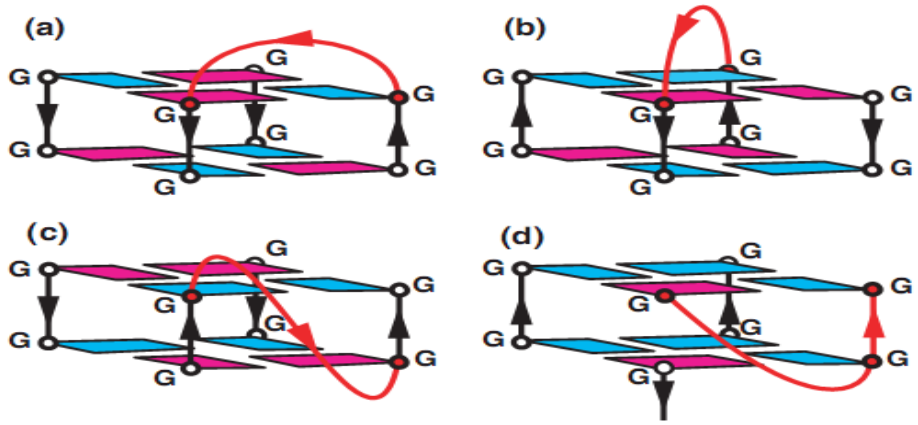
[1] Tetramolecular (tetrameric)
[2] Bimolecular (dimeric)
[3] Intermolecular
[4] Monomolecular (monomeric)
[5] Intramolecular

۱- لوپ Edge-wise یا لوپ کناری[1] : دو زنجیره‌ی موازی غیرهمسو مجاور را به‌هم متصل می‌کند و معمولاً از دو باقیمانده[2] یا بیشتر تشکیل شده است.

۲- لوپ مورب[3] : دو زنجیره‌ی موازی ناهمسو مقابل هم را به‌هم متصل می‌کند که معمولاً از سه باقیمانده یا بیشتر تشکیل شده است.

۳- Double-chain-reversal یا لوپ پروانه‌ای[4]: که دو زنجیره‌ی موازی مجاور را به‌هم متصل می‌کند که می‌تواند به بزرگی شش باقیمانده یا بیشتر و یا به کوچکی یک باقیمانده باشد.

۴- لوپ V شکل : دو گوشه‌ی یک هسته‌ی تتراد گوانین را به‌هم متصل می‌کند [۱۲-۱۳].



شکل ۱-۵: انواع حلقه‌ها a) لوپ کناری،b) لوپ مورب، c) لوپ chain-reversal، d) لوپ V شکل [۱۲].

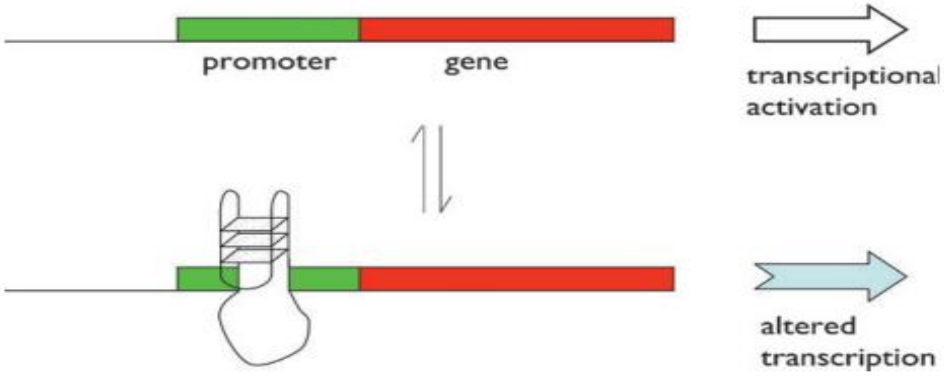
۶.۲.۱ حضور چهاررشته‌ای در پروموتور[5]

معمولاً ۱ کیلوباز بالادست[6] مکان شروع رونویسی[7] پروموتر قرار دارد. تقریباً نصف تمام ژن‌های شناخته‌شده یک موتیف[8] PG_4 ، در منطقه‌ی کلیدی کنترل فعالیتشان دارند، در حالی‌که موتیف تنظیمی TATA box تنها در حدود ۱۰٪ از ژن‌ها وجود دارد. به طور کلی بسیار محتمل است که ژن‌هایی که

[1] Lateral
[2] Residue
[3] Diagonal
[4] Propeller
[5] Promoter
[6] Upstream
[7] Transcription
[8] Motif

نیازمند سطوح بالایی از کنترل تنظیمی هستند در پروموتر آن‌ها چهاررشته‌ای وجود داشته باشـند. البتـه پروموترها تنها مکان‌هایی نیستند که G_4 در آنها نقش مهمی دارد و توالی‌های RNA نیز این توانـایی را دارند.

تشکیل چهاررشته‌ای در این ناحیه مانعی برای رونویسی توسط ممانعت از اتصال فاکتور مورد نیاز رونویسی به DNA هدف یا پیش رفتن فاکتور در طی DNA به حساب می‌آید (شکل ۱-۶) [۱۴-۱۶].



شکل ۱-۶: تشکیل G_4 در پروموتور می‌تواند سطح و ماهیت رونویسی ژن را تغییر دهد [۱۶].

ساختارهای G_4 در پروموتر یا توالی‌های بالادست، بر تنظیم مثبت یا منفی بیان ژن‌هایی مثل انسولین، c-Myc، K-ras، c-kit، VEGF، bcl2، PDF-A،HIF-1α و RFP2 دلالت دارند. bcl2 یک پروتوآنکوژن است که پروتئین ۲۵ kD را کد می‌کند. این پروتئین، عملکرد ویژه‌ای در متوقف کردن مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول دارد، بدون این‌که اثری بر تکثیر سلول داشته باشد. حدود ۲۵ ژن در خانواده‌ی bcl2 وجود دارند. ژن bcl2، مسئول ایجاد تعدادی از سرطان‌ها است. c-Myc نیز مانند bcl2 یک آنکوژن است که یک توالی تشکیل دهنده‌ی G_4 در ناحیه‌ی پروموتر آن وجود دارد. محصول پروتئینی پروتوآنکوژن c-Myc ژن‌های متنوعی را کنترل می‌کند که باعث افزایش تقسیم سلول می‌شوند.