

# Funkcija i organizacija G-kvadripleksa u genomu

---

**Kermek, Dora**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:408784>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Dora Kermek

**Funkcija i organizacija  
G-kvadripleksa u genomu**

Završni rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologiju na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Završni rad

### **Funkcija i organizacija G-kvadripleksa u genomu**

Dora Kermek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nukleinske kiseline mogu poprimiti različite oblike sekundarne strukture. Jedna od takvih struktura nastaje u sljedovima bogatim dušičnom bazom gvanin, pri čemu se četiri gvanina vodikovim vezama povezuju u planarnu strukturu G-kvarteta. Nekoliko G-kvarteta naslaganih jedan na drugi i poduprijeti šećerno-fosfatnom okosnicom tvore sekundarnu strukturu G-kvadripleksa. G-kvadripleksi mogu nastati kao dio deoksiribonukleinskih kiselina i kao dio ribonukleinskih kiselina. Važan su dio genoma eukariota, prokariota i virusa. U eukariotskim genomima pronalaze se u telomerama, promotorima gena te u transkriptomu. Njihova funkcija određena je položajem u genomu. Važni su regulatori aktivnosti telomeraze, transkripcije gena i translacije proteina, ali i poliadenilacije i prekrajanja introna. Mogu se detektirati *in vivo* pomoću antitijela i imunofluorescencijom, a dijelovi genoma s potencijalom formiranja G-kvadripleksa određuju se računalnim algoritmima. Male molekule ili ligandi mogu se specifično vezivati i stabilizirati sekundarnu strukturu G-kvadripleksa. Stabilizacijom G-kvadripleksa u pojedinim regijama genoma moguće je potisnuti proliferaciju tumora, zbog čega se ovakvi ligandi intenzivno istražuju s ciljem pronalaska antitumorskih lijekova.

(28 stranica, 12 slika, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: sekundarna struktura, G-kvartet, telomera, promotor, transkriptom

Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Seminar Paper

### **Function and organization of G-quadruplexes in the genome**

Dora Kermek

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nucleic acids can adopt various types of secondary structures. One of such structures arises in guanine-rich sequences, where four guanines link with hydrogen bonds in the planar G-quartet structure. Few G-quartets stacked on each other and supported by the sugar-phosphate backbone create a G-quadruplex secondary structure. G-quadruplexes can arise as a part of the deoxyribonucleic acids, as well as ribonucleic acids. They are an important part of the eukaryote, prokaryote, and virus genomes. In eukaryotic genomes, they can be found in telomeres, gene promoters, and as part of the transcriptomes. Their function is determined by their position in the genome. They are important regulators of telomerase activity, gene transcription, protein translation, polyadenylation, and intron splicing. *In vivo* detection of G-quadruplexes is possible using antibodies and immunofluorescence, and part of the genome with the potential of forming G-quadruplex can be determined using computational algorithms. Small molecules or ligands can specifically bind and stabilize the secondary structure of G-quadruplexes. By stabilizing the G-quadruplex structures in certain regions of the genome, it is possible to suppress the proliferation of tumors, which is why such ligands are intensively researched with the aim of finding antitumor therapeutics.

(28 pages, 12 figures, 57 references, original in Croatian)

Keywords: secondary structure, G-quartet, G-quadruplex, telomere, promoter, transcriptome

Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

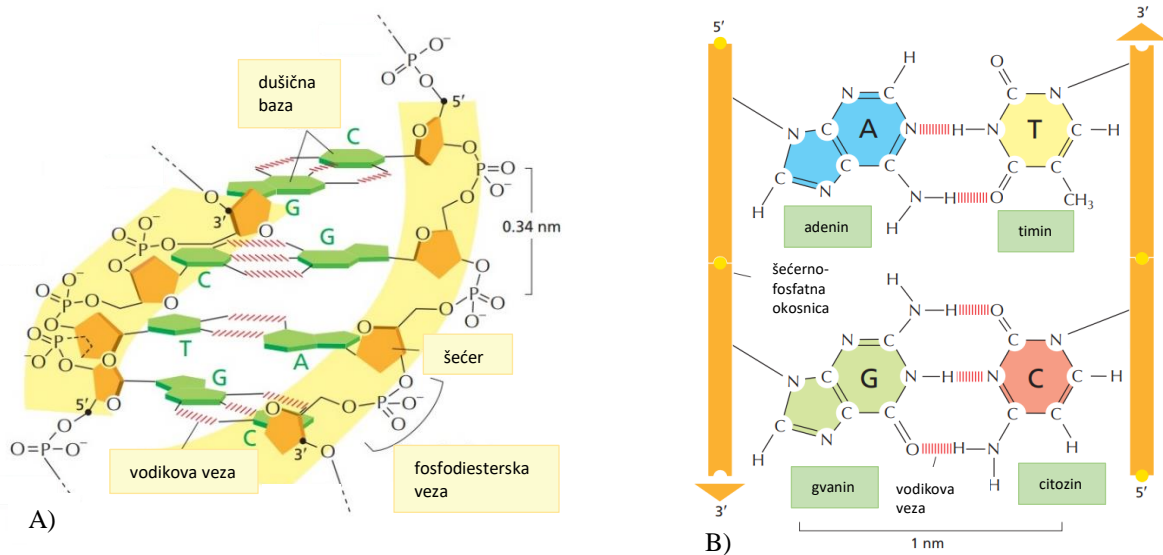
# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Topologija G-kvadripleksa.....	4
3. G-kvadripleksi kao dio eukariotskog genoma.....	8
3.1. Telomere.....	8
3.1.1. Skraćivanje i produživanje telomera .....	8
3.1.2. Građa i struktura telomera.....	9
3.1.3. Funkcija telomera .....	10
3.2. Promotori gena .....	11
3.2.1. Funkcija G-kvadripleksa na primjeru promotora onkogeno <i>c-MYC</i> .....	11
3.3. Transkriptom .....	12
3.3.1. G-kvadripleksi kao dio glasničke RNA .....	12
3.3.2. G-kvadripleksi kao dio nekodirajućih RNA.....	15
4. Detekcija G-kvadripleksa u biološkim sustavima .....	16
4.1. Detekcija G-kvadripleksa <i>in vivo</i> .....	16
4.2. Računalna detekcija G-kvadripleksa .....	18
5. Interakcija G-kvadripleksa s malim molekulama.....	19
5.1. Primjeri liganda G-kvadripleksa .....	19
6. G-kvadripleksi u prokariotskim i virusnim genomima .....	21
7. Zaključak.....	22
8. Literatura .....	23
9. Životopis.....	28

# 1. Uvod

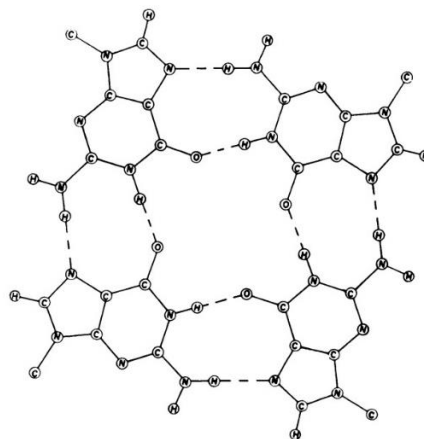
Nukleinske kiseline su linearni makromolekulski polimeri sastavljeni od nukleotida, monomera koji sadržavaju šećer pentozu, dušičnu bazu i fosfatnu skupinu. Šećeri povezani fosfatnim skupinama čine okosnicu, a dušične baze omogućavaju povezivanje lanaca u različite sekundarne strukture, od kojih je najčešća dvostruka uzvojnica. S obzirom na vrstu šećera koji je sastavni dio nukleotida, nukleinske kiseline se dijele na deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA), koja sadrži šećer deoksiribozu, i ribonukleinsku kiselinu (RNA), koja sadrži šećer ribozu. Najčešće dušične baze koje ulaze u sastav nukleinskih kiselina su adenin (A), gvanin (G), timin (T), uracil (U) i citozin (C). Prema kemijskoj strukturi, adenin i gvanin pripadaju purinima, a timin, uracil i citozin pirimidinima (Berg i sur. 2013, Albert i sur. 2015).

Dušična baza povezana samo na šećer pentozu *N*-glikozidnom vezom naziva se nukleozid, a ovisno o tome koja je baza pridodana na šećer radi se o nukleozidima adenzinu (A), gvanozinu (G), timidinu (T), uridinu (U) i citidinu (C). Dodatkom jedne, dvije ili tri fosfatne skupine na 5'-hidroksilnu (-OH) skupinu pentoze nastaju nukleotidi. Nukleotidi se imenuju prema pripadajućem nukleozidu i broju fosfatnih skupina. U nukleinskim kiselinama nukleotidi su međusobno povezani kovalentnim fosfodieterskim vezama koje povezuju 3'-hidroksilnu (-OH) skupinu jednog šećera s 5'-hidroksilnom (-OH) skupinom drugog šećera. Prema tome, svaki polinukleotidni lanac kemijski je polaran, odnosno krajevi lanca kemijski su različiti (Slika 1.A). Dušične baze nukleotida sadrže slobodne akceptore i donore vodikovih veza, zbog čega između lanaca nukleotida mogu nastati vodikove interakcije. Unutar dvostruke uzvojnice dvjema vodikovim vezama povezuju se adenin i timin, odnosno adenin i uracil, a trima vodikovim vezama povezuju se citozin i gvanin. Specifično sparivanje navedenih baza naziva se komplementarno, a vodikove veze između njih nazivaju se Watson-Crickove interakcije (Slika 1.B). Orijentacija dvaju lanaca unutar dvostruke uzvojnice je antiparalelna, odnosno 5'- i 3'-krajevi nalaze se na suprotnim stranama lanaca (Berg i sur. 2013, Alberts i sur. 2015).



**Slika 1. A)** Dvostruka uzvojnica molekule DNA. Nukleotidi su međusobno povezani fosfodiesterskom vezom, a između dvaju polarnih antiparalelnih lanaca stvaraju se vodikove veze. **B)** Detaljan prikaz komplementarnih baza u dvostrukoj uzvojnici molekule DNA. Dvije vodikove veze stvaraju se između adenina (A) i timina (T), a tri vodikove veze stvaraju se između gvanina (G) i citozina (C). Preuzeto i prilagođeno prema Alberts i sur. 2015.

Opažanje da gvanilinska kiselina, nukleinska kiselina građena od gvanozin monofosfata, tvori spiralne agregate s 4 podjedinice po okretu datira iz 1962. godine. Nakon eksperimenta kojim Ralph i suradnici uviđaju nastanak organiziranih i iznimno stabilnih makrostrukture između tri- i tetranukleotida deoksiribogvanilinske kiseline (Ralph i sur. 1962), Gellert i suradnici zapažaju da i sama gvanilinska kiselina može tvoriti regularne strukture. Predlažu razmještaj gvanina unutar takvih struktura (Slika 2). U predloženom razmještaju, četiri gvanina poredana su u planarnu strukturu na način da svaki tvori dvije vodikove veze s dva susjedna gvanina, što je ukupno četiri vodikove veze po nukleotidu. Na taj način nastaju planarni tetrameri linearnih agregata (Gellert i sur. 1962).



**Slika 2.** Predloženi razmještaj četiri gvanina unutar stabilnih makromolekulskih struktura gvanilinske kiseline. Preuzeto iz Gellert i sur., 1962.



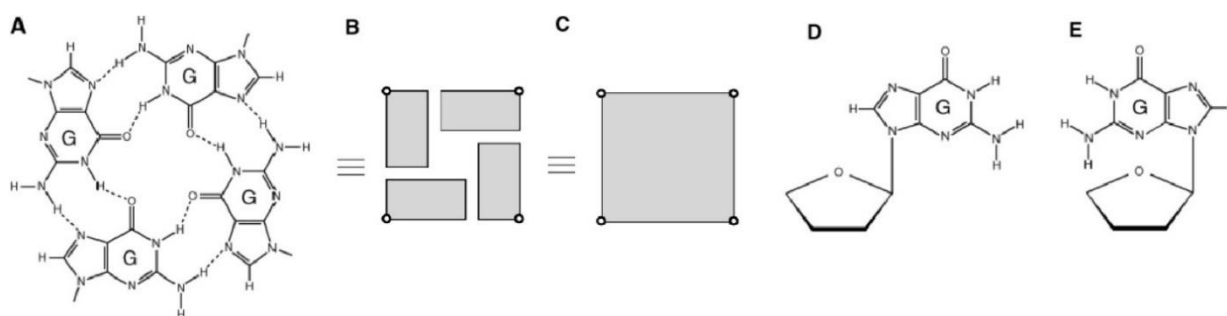
U kasnim 1980-im, biokemijskim eksperimentima je dokazano da oligonukleotidi koji se sastoje od 3 ili 4 gvanina (poput telomera), spontano tvore četverolančane DNA strukture zvane G-kvadripleksi. Gvanini su u takvim strukturama povezani vodikovim vezama u planarne jedinice nazvane G-kvarteti (G-tetrad), na način kao što su predložili Gellert i suradnici, a njihovo stvaranje ovisi o prisutnosti monovalentnih kationa (Sen i Gilbert 1988, Sundquist i Klug 1989, Williamson i sur. 1989).

Danas je poznato da G-kvadripleksi čine esencijalne dijelove genoma. Smatraju se važnim regulatorima staničnih procesa, uključeni su u produljenje telomera, u mehanizme genske ekspresije i genske nestabilnosti, a mnoge druge funkcije još uvijek su neistražene (Popena i sur. 2020, Gong i sur. 2021).

Cilj ovog preglednog rada je detaljno opisati topologiju G-kvadripleksa, sumirati njihovu organizaciju u različitim genomima te povezati topologiju i organizaciju s esencijalnom funkcijom G-kvadripleksa u genomima, s naglaskom na genom eukariota.

## 2. Topologija G-kvadripleksa

Četiri gvanina ciklički povezana vodikovim vezama tvore G-kvartete ili G-tetrade (Slika 3.A-C). Sparivanje između ovih gvanina naziva se nekanonsko, s obzirom da se ne radi o Watson-Crickovim interakcijama. Nekoliko kvarteta naslagani jedan na drugi i poduprijeti sa četiri šećerno-fosfatne okosnice čine G-kvadriplekse, četverolančane sekundarne strukture nukleinskih kiselina (Slika 4.A-D) (Gellert i sur. 1962, Sen i Gilbert 1988). Udaljenost između dva G-kvarteta unutar G-kvadripleksa je oko 3,3 Å (Forman i sur. 2000), a za stvaranje jednog G-kvadripleksa potrebna su minimalno dva kvarteta. Svaka baza koja je dio kvarteta tvori dva nekanonska para, čime su 4 baze povezane sa sveukupno 8 vodikovih veza (Popenda i sur. 2020)



**Slika 3.** A – razmještaj i vodikove veze između četiri gvanina u G-kvartetu. (B-C) Shematski prikaz G-kvarteta, B - svaki gvanin prikazan je kao pravokutnik, C –G-kvartet prikazan je kao kvadrat. (D-E) - Konformacije N-glikozidne veze između šećera pentoze i gvanina: D – *anti* konformacija, E – *syn* konformacija. Prilagođeno prema Phan 2010.

N-glikozidna veza između šećera pentoze i dušične baze u G-kvadripleksima može biti u *anti* ili u *syn* konformaciji (Slika 3.D-E). S obzirom da su lanci nukleinskih kiselina kemijski polarno orijentirani, relativna orijentacija lanaca G-kvadripleksa (G-linija), zajedno s konformacijom glikozidne veze gvanina i šećera pentoze posljedično definiraju obrasce utora unutar srži G-kvarteta. Navedena dva faktora međusobno su ovisna i koriste se u klasifikaciji G-kvartetne srži. Postoje četiri različite relativne orijentacije lanaca u srži (Slika 4.A-D):

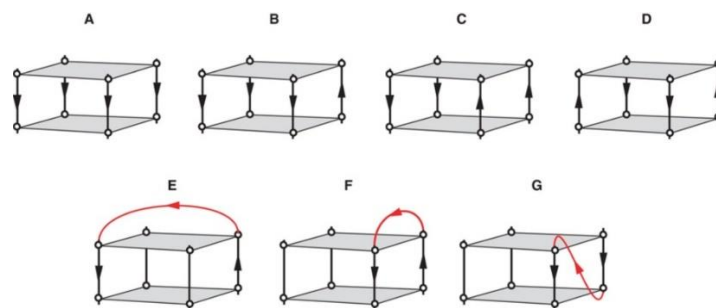
- srž s paralelnim lancima - četiri lanca u istoj orijentaciji (Slika 4.A),
- hibrdina (3+1) srž - tri lanca u orijentirana u jednom smjeru, a četvrti u suprotnom (Slika 4.B),
- antiparalelna srž (gore-gore-dolje-dolje) - dva susjedna lanca u jednom smjeru, a druga dva u suprotnom (Slika 4.C),

- d) antiparalelna srž (gore-dolje-gore-dolje) - dva nasuprotna lanca u jednom smjeru i druga dva u suprotnom (Slika 4.D).

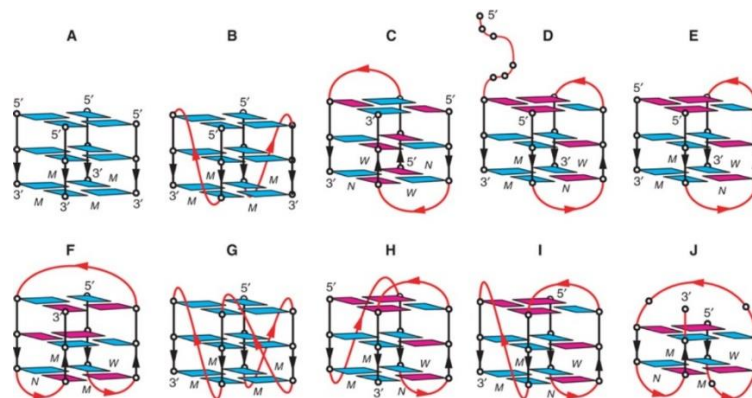
Konformacija *N*-glikozidne veze gvanozina unutar G-tetrada geometrijski je povezana s relativnom orijentacijom lanaca, redom (Slika 4.A-D): (a) *anti•anti•anti•anti* ili *syn•syn•syn•syn*, (b) *syn•anti•anti•anti* ili *anti•syn•syn•syn*, (c) *syn•syn•anti•anti*, (d) *syn•anti•syn•anti* (Patel i sur. 2007, Phan 2010).

Ovisno o broju lanaca od kojih su nastali, nukleinske kiseline mogu tvoriti monomerne, dimerne i tetramerne G-kvadruplekse (Slika 5.A-J). Poveznice između lanaca kvadrupleksa nazivaju se petlje. Postoje 3 glavna oblika petlja (Slika 4.E-G):

- dijagonalna petlja koja spaja dva nasuprotna antiparalelna lanca (Slike 4.E)
- lateralna petlja koja povezuje dva susjedna antiparalelna lanca (Slike 4.F)
- dupla dvolančana reverzna petlja (rubna petlja, *propeller loop*) koja spaja dva susjedna paralelna lanca (Slika 4.G) (Phan 2010).

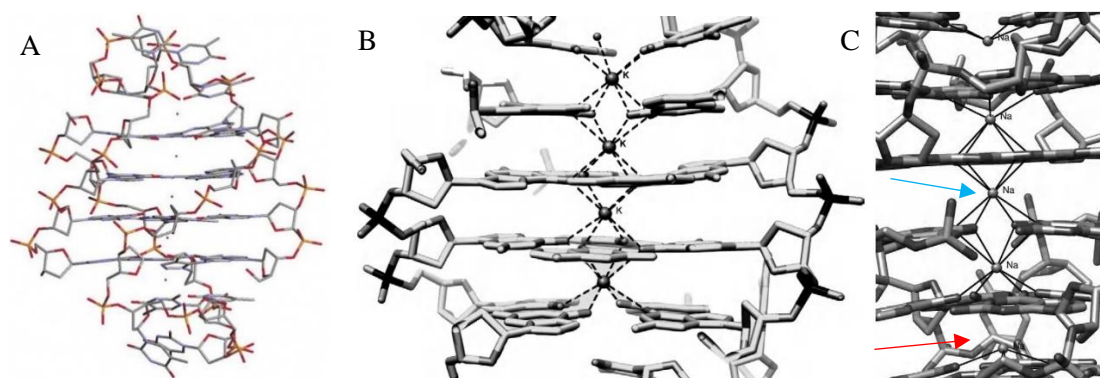


**Slika 4.** (A-D) Shematski prikaz četiri tipa G-kvartetne srži: **A** – srž s paralelnim lancima, **B** – hibridna (3+1) srž, **C** – antiparalelna srž (gore-gore-dolje-dolje), **D** – antiparalelna srž (gore-dolje-gore-dolje). (E-G) Shematski prikaz. Strelica označava usmjerenje lanaca 5'→3'. Preuzeto iz Phan 2010.



**Slika 5.** **A** – tetramerni G-kvadrupleks. (**B-E**) različiti oblici dimernih G-kvadrupleksa. (**F-J**) različiti oblici monomernih G-kvadrupleksa. Crvenom bojom označene su petlje, a strelica označava usmjerenje lanaca 5'→3'. Preuzeto iz Phan 2010.

Stvaranje i stabilnost G-kvadripleksa ovise o prisustvu kationa alkalijskih metala u fiziološkim koncentracijama (Lipps i Rhodes 2009), pri čemu kalijeve kationi ( $K^+$ ) bolje stabiliziraju četverolančane strukture od natrijevih ( $Na^+$ ). Kationi koordiniraju karbonylne (-CO) skupine gvanina u središtu G-kvartetne srži, a njihova precizna lokacija ovisi o ionskom radijusu. Radijus kalijeve kationa prevelik je za smještaj unutar samog G-kvarteta, ali se može nalaziti između susjednih uz udaljenost 2,8 – 2,9 Å od svakog od osam O6 karbonylnog atoma gvanina, čime se stvara bipiramidno antiprizmatsko uređenje (Slika 6) (Haider i sur. 2002). Natrijevi kationi dovoljno su malog radijusa za smještaj unutar četiri gvanina G-kvarteta, no ovakav raspored prisutan je samo na krajevima kanala G-kvadripleksa. Na ostalim dijelovima njegova distribucija nije ravnomjerna i razmak između dva natrijeva kationa varira između 3,4 i 4,3 Å te poprima bipiramidno antiprizmatsko uređenje, poput kalijeve iona (Neidle 2012). Primijećena je koordinacija i stabilizacija G-kvadripleksa i drugim metalnim ionima, poput kationa rubidija, stroncija ( $Rb^+$  i  $Sr^{2+}$ , Ida i sur. 2007), cezija ( $Rb^+$  i  $Cs^+$ , Cesare Marincola i sur. 2009) i kalcija ( $Ca^{2+}$ , Lee i sur. 2007), no u puno manjoj mjeri u odnosu na kalijeve katione.



**Slika 6.** Kationi stabiliziraju G-kvadriplekse. **A** – G-kvadripleksi vrste *Oxytricha nova* koordinirani s 5 kalijeve kationa. Prilagođeno prema Haider i sur. 2002. **B** – Koordinacija kalijeve iona s kisikovim atomima gvanina unutar G-kvadripleksa vrste *Oxytricha nova* i naznačeno bipiramidno antiprizmatsko uređenje. Prilagođeno prema Neidle 2012. **C** – Koordinacija G-kvadripleksa natrijevim ionima. Natrijevi ioni nejednoliko su raspoređeni unutar kanala, uz gotovo planarnu koordinaciju kisikovim atoma gvanina na rubovima kanala (crvena strelica) i bipiramidno antiprizmatsko uređenje na ostalim dijelovima kanala (plava strelica). Prilagođeno prema Neidle 2012.

Sekundarna struktura G-kvadripleksa može se formirati u deoksiribonukleinskim i ribonukleinskim kiselinama. Šećer riboza, dio ribonukleinske kiseline, sadrži 2'-hidroksilnu (-OH) skupinu koja potiče stvaranje većeg broja unutarmolekulskih interakcija, što dovodi do veće stabilnosti RNA G-kvadripleksa. Dodatna hidroksilna skupina riboze konformacijski

ograničava topologiju RNA G-kvadripleksa na način da *N*-glikozidna veza ne može poprimiti *syn*-konformaciju, što je preduvjet za antiparalelnu topologiju kvadripleksa. Zbog ograničene konformacije, RNA G-kvadripleksi manje su ovisni o vanjskim uvjetima i njihova je raznolikost smanjena (Argawala i sur. 2015). Iako konformacije DNA G-kvadripleksa međusobno imaju nisku energijsku razliku, pretvorba iz jedne u drugu je spora, što upućuje na postojanje visokoenergijskih intermedijera (Yang i Lin, 2019).

### 3. G-kvadripleksi kao dio eukariotskog genoma

Nukleinske kiseline poprimaju sekundarne strukture G-kvadripleksa u dijelovima eukariotskih genoma koji su bogati gvaninima, poput telomera i promotorskih regija gena. Pronalaze se i u transkriptomima, specifično u 5'- i 3'-netranslatiranim regijama (UTR, eng. *untranslated region*) i intronima glasničke RNA (mRNA, eng. *messenger RNA*), te u malim nekodirajućim RNA molekulama, poput mikroRNA (miRNA, eng. *microRNA*) (Lipps i Rhodes 2009, Agarwala i sur. 2015).

#### 3.1. Telomere

Telomere su očuvana uzastopna ponavljanja nukleotidnih sljedova na krajevima eukariotskih linearnih kromosoma čija se duljina razlikuje među vrstama (O'Sullivan i Karlseder 2010). Primjerice, telomere praživotinja sadrže 20-70 heksamernih TTGGGG ponavljanja, a telomere kvasaca GGTTACA heptamerno ponavljanje ukupne duljine do 300 pb. Telomere biljaka sadrže heptamerna ponavljanja TTTAGGG i duljine su između 2 i 100 kb. Kod kralježnjaka, kromosomski krajevi sadrže heksamerna TTAGGG ponavljanja, a najdulje ponavljanje otkriveno je u vrsti *Mus musculus* i duljine je do 150 kb. Ljudske telomere najčešće su duljine između 10 i 15 kb (Srinivas i sur. 2020).

##### 3.1.1. Skraćivanje i produljivanje telomera

Prilikom replikacije linearnih kromosoma, ne dolazi do potpunog udvostručenja DNA na kromosomskim krajevima, što rezultira progresivnim skraćivanjem telomera sa svakom staničnom diobom. Replikacija započinje stvaranjem RNA-početnice na 5'-kraju DNA koja se nakon replikacije zamjenjuje s deoksiribonukleotidima. Međutim, na samom kraju linearnog kromosoma ova zamjena nije moguća, što dovodi do degradacije i gubitka terminalnih dijelova kromosoma. Ovaj proces naziva se i „problem kraja replikacije“ (eng. *end replication problem*). Ukoliko na krajevima linearnih kromosoma ne bi postojala dodatna telomerna ponavljanja, zbog „problema kraja replikacije“ dio genetske informacije svakom bi se diobom gubio (Bryan 2020).

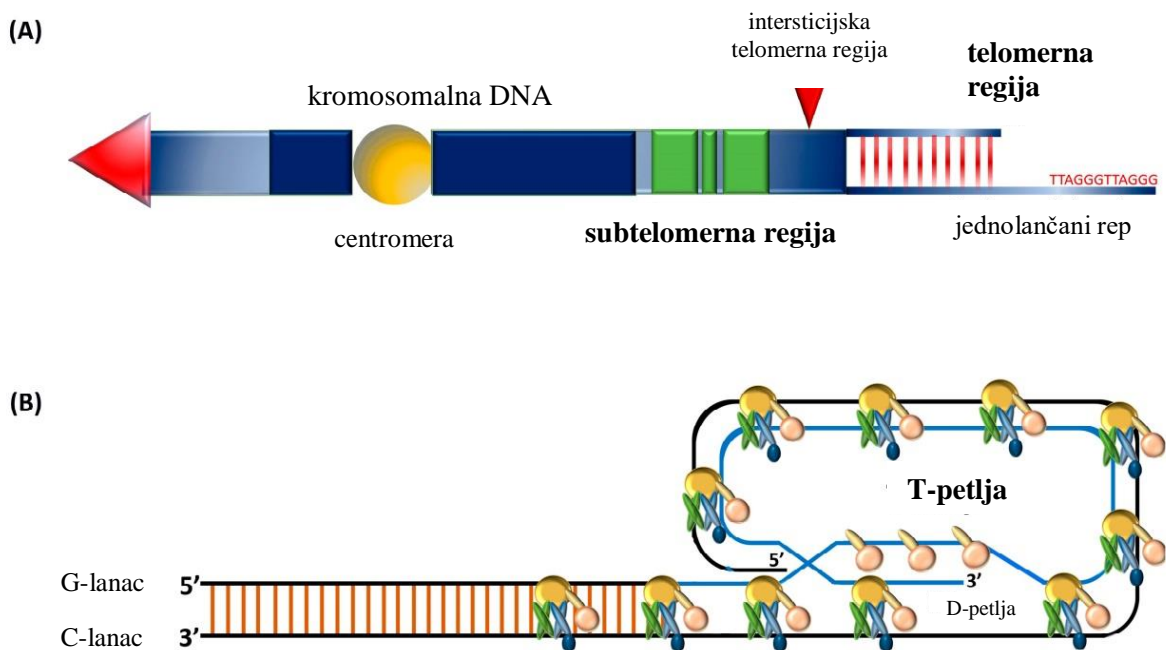
Telomeraza je ribonukleinski protein zaslužan za produljenje telomera, čime se suprotstavlja replikacijskom skraćivanju telomera. Sastoji se od katalitičke podjedinice, telomerazne reverzne transkriptaze (TERT) i RNA molekule (TERC) koja djeluje kao kalup za produživanje telomernih ponavljanja (Bryan 2020). Telomeraza je aktivna u germinativnim,

hematopoetskim, matičnim i mitotski aktivnim stanicama te u stanicama koje se brzo regeneriraju. Utišavanje telomerase i skraćivanje telomera u ljudskim stanicama sprečava nekontroliranu staničnu proliferaciju (Trybek i sur. 2020). Stanice raka karakterizira visoka telomernost koja stanicama omogućava beskonačne diobe (Kim i sur. 1994, Neidle 2012).

### 3.1.2. Građa i struktura telomera

Telomere uključuju proksimalno dvolančane i distalno jednolančane regije (Slika 7.A) koje su od kromosomske DNA odvojene subtelomernom i intersticijskom telomernom regijom. Vrlo su krhke intrinzične strukture stabilizirane vezama s kompleksom šelterin proteina (eng. *shelterin proteins*). Jednolančane G-bogate regije telomera mogu se uklopiti u dvolančane regije tvoreći trostruku zavojnicu i t-petlju (eng. *t-loop*, Slika 7.B) ili se mogu smatati u četverolančane strukture G-kvadriplekse (Srinivas i sur. 2020). Prvi biološki relevantni G-kvadripleksi uočeni su upravo u telomernoj DNA (Henderson i sur. 1987).

Kompleks šelterin proteina povezuje se s telomernim TTAGGG ponavljanjem. Kompleks se sastoji od ukupno 6 proteina: TRF1, TRF2, POT1 koji direktno prepoznaju telomerne sljedove i koji su međusobno povezani proteinima TIN2, TPP1 i Rap1. Protein POT 1 (eng. *protection of telomeres 1*) smatra se najvažnijim zaštitnim proteinom jednolančanih telomernih nastavaka u ljudskim stanicama. Veže se direktno na 3'-jednolančani rep telomera. Kako bi se povezao za telomere, protein POT1 može poremetiti unutarmolekulsku strukturu G-kvadripleksa. Vezivanje proteina POT1 za telomere i njegovo odmotavanje kvadripleksa utječu na mogućnost produljenja telomera pomoću telomerase. Telomeraza se ne može vezati za telomere koje su u konformaciji antiparalelnih G-kvadripleksa. Samim time što razrješuje sekundarnu strukturu G-kvadripleksa u linearnu konformaciju, protein POT1 povećava vezivanje telomerase na telomere. S druge strane, paralelni G-kvadripleksi mogu biti supstrat za telomerazu (Bryan 2020).



**Slika 7.** **A** – shematski prikaz telomerne i subtelomerne regije kromosoma. Telomerna regija uključuje dvolančanu regiju duljine 50-300 nukleotida i jednonlačani rep bogati gvaninima. Subtelomarna regija (zeleno) uključuje regije gena isprepletenih unutar ponavljajućih elemenata i intersticijsku telomernu sekvenciju (crvena strelica). **B** – kompleks šelterin proteina, jednonlačani rep bogat gvaninima omata se u dvostruku zavojnicu tvoreći T-petlju. Prilagođeno prema Srinivas i sur. 2020.

### 3.1.3. Funkcija telomera

Glavna uloga telomera leži u zaštiti krajeva kromosoma od degradacije i gubitka genetske informacije. Telomere zaštićuju kromosome od abnormalnih rekombinacija, kromosomskih fuzija i degradacije egzonukleazama. Njihovo skraćivanje (rezultat „problema kraja replikacije“) djeluje kao molekularni sat. Nakon određenog broja dioba, telomere postaju previše skraćene i dostižu kritičnu duljinu, čime se stanica usmjerava u put replikativne senescencije ili apoptoze (Trybek i sur. 2020). U samoj stabilizaciji telomera sudjeluju G-kvadripleksi. Tvoreći telomerne kape onemogućuju pristup telomerazi, čime sprečavaju nastanak tumorskih stanica (Srinivas i sur. 2020, Bryan 2020).



## 3.2. Promotori gena

G-kvadripleksi pojavljuju se u promotorskim regijama gena, gdje funkcioniraju kao transkripcijski regulatori (Siddiqui-Jain i sur. 2002). Prva indikacija G-kvadripleksa u promotorima gena datira iz 1982. godine za kokošji gen za  $\beta$ -globulin (Larsen i Weintraub 1982, Wood i Felsenfeld 1982), nakon čega su strukture G-kvadripleksa otkrivene u promotorima gena koji kodiraju inzulin, c-MYC, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , BCL-2, MtCK, K-RAS, c-KIT, RET, PDGF-A, c-MYB, hTERT i PDGF-R $\beta$ , te u mišjem  $\alpha$ 7 integrinu (Yang i Lin 2019).

Kvadripleksi predstavljaju *cis*-regulacijske elemente ljudskog genoma koji su računalnim metodama pronađeni u promotorima više od 40 % gena ljudskog genoma (Huppert i Balasubramanian 2006). Potencijal formiranja kvadripleksa veći je unutar onkogeno nego u tumorsupresorskim genima (Eddy i Maizels 2006).

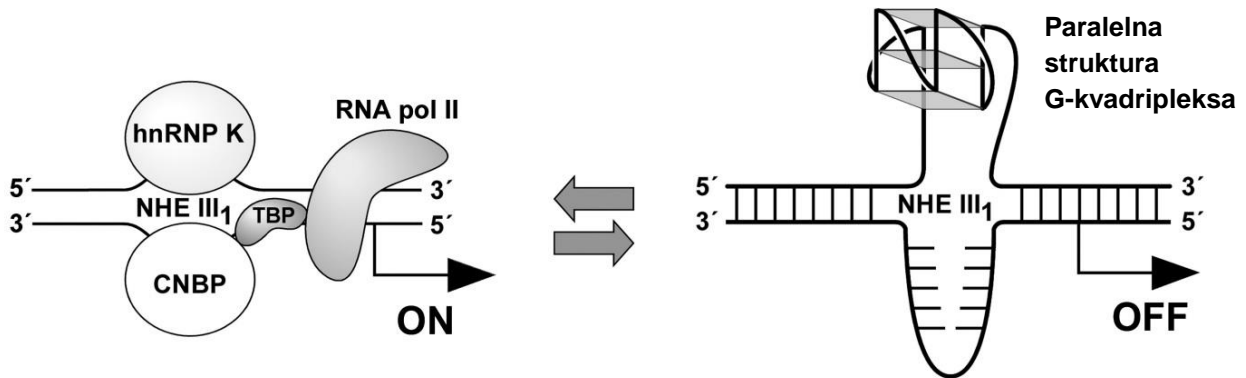
Za razliku od ponavljajućih sljedova u telomernim sljedovima, G-kvadripleksi koji se nalaze u promotorima jedinstveni su po svom broju i duljini G-sljedova. Vrlo često sadrže više od četiri G-linije (dio lanca DNA bogat gvaninom, četiri takva lanca tvore kvadripleks) s nejednakim brojem gvanina te mogu stvarati višestruke kvadriplekse kroz raznovrsne kombinacije G-linija (Chen i Yang 2012).

### 3.2.1. Funkcija G-kvadripleksa na primjeru promotora onkogeno c-MYC

Transkripcijski faktor c-MYC kodiran je proto-onkogenom c-MYC. Protein c-MYC eksprimira se tijekom embriogeneze i u odraslim tkivima s visokim kapacitetom proliferacije, poput epiderme kože i crijeva. Osim što potiče staničnu proliferaciju, ekspresija proteina c-MYC inhibira diferencijaciju stanica, zbog čega se povezuje s ljudskim i animalnim malignostima, poput karcinoma dojke, kolona, vrata maternice i pluća, osteosarkomima, glioblastomima i mijeloidnim leukemijama (Pelengaris i sur. 2002, Yang i Hurley 2006).

Proksimalna regija promotora onkogeno c-MYC sadrži element III<sub>1</sub> hipersenzibilan na nukleaze (NHE III<sub>1</sub>, eng. *nuclease hypersensitivity element III<sub>1</sub>*) koji kontrolira 80 – 90 % transkripcijske aktivnosti ovog gena. Element NHE III<sub>1</sub> bogat je gvaninima i tvori unutarmolekulsku paralelnu strukturu G-kvadripleksa. G-kvadripleksi ovog elementa mogu poprimiti četiri različite izomerne strukture s gvaninima u *anti*-konformaciji. Formacija G-kvadripleksa onemogućava vezivanje transkripcijskih aktivatora, poput proteina CNBP koji se može vezivati samo za jednolančanu DNA (Slika 8). Nemogućnost vezivanja

transkripcijskih aktivatora sprečava inicijaciju transkripcije, što u konačnici rezultira utišavanjem gena *c-MYC* (Yang i Hurley 2006).



**Slika 8.** Model aktivacije i represije transkripcije gena *c-MYC* kroz konverziju paranemične sekundarne strukture DNA u transkripcijski aktivnu jednolančanu DNA. Oznaka „ON“ na slici označava aktivaciju transkripcije, a hnRNP i CNBP predstavljaju transkripcijske aktivatore koji se vezuju za jednolančanu DNA. Oznaka „OFF“ na slici označava represiju transkripcije povezanu s formacijom paralelne strukture G-kvadripleksa. Preuzeto iz Yang i Hurley 2006.

### 3.3. Transkriptom

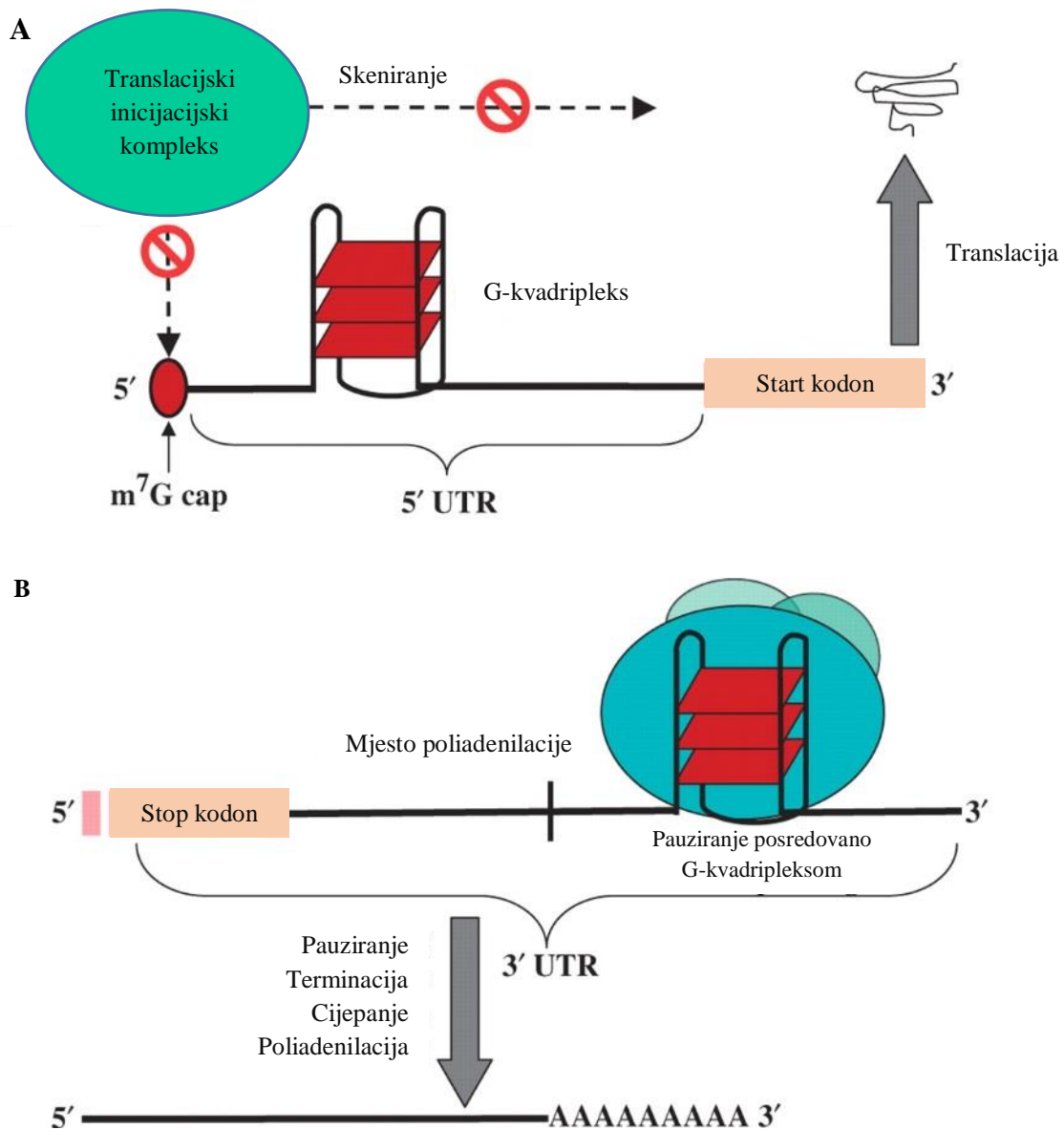
Transkriptom stanice ili tkiva predstavlja skup svih molekula RNA koje se u njima transkribiraju. Dinamičan je i reprezentira trenutno stanje stanice. Sastoji se od glasničke ili kodirajuće RNA (mRNA) i različitih nekodirajućih RNA (ncRNAs, eng. *non-coding RNAs*) (Ranganathan i sur. 2019).

#### 3.3.1. G-kvadripleksi kao dio glasničke RNA

Dijelovi ljudske mRNA u kojima se mogu formirati G-kvadripleksi su u 5'- i 3'-netranslatiranim regijama (UTR, eng. *untranslated region*) (Huppert i sur. 2008). Netranslatirane regije na krajevima mRNA dio su *cis*-regulacijskih elemenata te imaju važnu ulogu u stabilnosti i zaštiti mRNA, modulaciji transporta iz jezgre, lokalizaciji mRNA u stanici te u inicijaciji i efikasnosti translacije (Chatterjee i Pal 2009). Računalnim metodama određeno je da 19,3 % gena od svih poznatih protein-kodirajućih gena čovjeka potencijalno sadrži G-kvadriplekse u 5'- ili 3'-nekodirajućoj regiji mRNA. U 5'-netranslatiranim regijama postoji tendencija za stvaranje kvadripleksa uz kraj 5'-UTR-a, dok se u 3'-netranslatiranim regijama pojavljuju odmah nakon 3'-kraja kodirajućeg slijeda mRNA. Stvaranje G-kvadripleksa na ovim regija mRNA ima bitnu ulogu u regulaciji transkripcije i translacije (Slika 9) (Huppert i sur. 2008). Stabilni RNA G-kvadripleksi u blizini 5'-metilgvanozinske kape sterički sprečavaju

inicijaciju translacije blokiranjem vezanja inicijacijskog kompleksa za 5'-kapu ili mogu poremetiti proces skeniranja i traženja start kodona pomoću male ribosomske podjedinice (Kumari i sur. 2007, Huppert i sur. 2008). Neki od proteina u čijim 5'-netranslatiranim regijama mRNA G-kvadripleksi djeluju kao represori translacije su NRAS, Zic-1, TRF-2, BCL2 i ESR (Agarwala i sur. 2015). S druge strane kodirajuće regije mRNA, G-kvadripleksi imaju ulogu u pauziranju transkripcije na 3'-kraju gena, što dovodi do učinkovitog cijepanja na mjestu poliadenilacije i do učinkovite poliadenilacije. Bez pravovremene terminacije transkripcije, dobiveni transkript sadržavat će i susjedne gene što posljedično dovodi do poremećaja u njihovoj ekspresiji (Huppert i sur. 2008). Ovakvo djelovanje G-kvadripleksa može se usporediti s Rho-neovisnom terminacijom transkripcije kod prokariota, a pojavljuje se i u nekim mitohondrijskim genima. Kod gena *LRP5* i *FXR1* G-kvadripleksi u 3'-netranslatiranoj regiji povećavaju efikasnost alternativne poliadenilacije na način da generiraju stvaranje nekoliko kratkih transkripata (Agarwala i sur. 2015). U mRNA proteina PSD-95 i CaMKIIa G-kvadripleksi 3'-netranslatiranih regija imaju važnu ulogu u lokalizaciji mRNA u stanici (Subramanian i sur. 2011).

Osim u 5'- i 3'-netranslatiranim regijama mRNA, G-kvadripleksi mogu se stvarati i u intronima. Do sada su otkriveni u intronima nekolicine ljudskih gena, poput *hTERT*, *BclxL*, *TRF2*, *FMRP*, *FMRI*, *TP53*, *IGFNI* i *PAX9*, u kojima utječu na njihovo prekrajanje (Marcel i sur. 2010, Ribeiro i sur. 2014, Fay i sur. 2017, Verma i Das 2018). Formacija G-kvadripleksa u nekim intronima utišava prekrajanje (gen *hTERT*), dok u drugima pojačava (geni *FMRI*, *PAX9*) (Marcel i sur. 2010, Ribeiro i sur. 2014).



**Slika 9.** Shematski prikaz odabranih uloga G-kvadripleksa u 5'- i 3'-netranslatiranim regijama mRNA. **A** – prisustvo stabilnih RNA G-kvadripleksa blizu 5'-kape inhibira translaciju na način da onemogućava vezanje translacijskog inicijacijskog kompleksa na 5'-kapu i maloj ribosomalnoj podjedinici skeniranje transkripta u potrazi za start kodonom. **B** – prisustvo stabilnih G-kvadripleksa na početku 3'-netranslatirane regije omogućava terminaciju transkripcije što dovodi do efikasnog cijepanja na poliadenilacijskom mjestu i omogućava poliadenilaciju. Prilagođeno prema Huppert i sur. 2008.

### 3.3.2. G-kvadripleksi kao dio nekodirajućih RNA

Strukture G-kvadripleksa mogu se stvarati i u nekodirajućim RNA molekulama, poput primarne mikroRNA (pri-miRNA, eng. *primary microRNA*), prekursorske mikroRNA (pre-miRNA, eng. *precursor microRNA*) i u zrelim mikroRNA (miRNA, eng. *microRNA*) (Chan i sur. 2018).

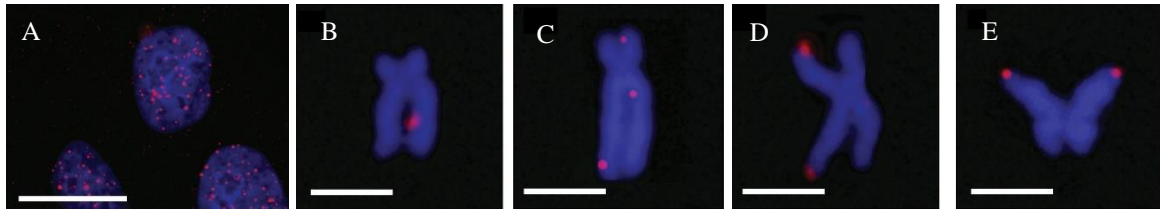
Zrele mikroRNA pripadaju malim nekodirajućim molekulama RNA duljine oko 22 nukleotida koje imaju iznimnu ulogu u post-transkripcijskoj regulaciji. Biogeneza miRNA sastoji se od serije visokokoordiniranih biokemijskih koraka. Prvi korak je transkripcija primarne mikroRNA pomoću RNA-polimeraze II. Nakon toga procesirajući kompleks koji sadrži protein Drosha u jezgri iz pri-miRNA generira prekursoru mikroRNA. Pre-miRNA tvori sekundarnu strukturu ukosnice koju unutar citoplazme prepoznaje nukleaza Dicer. Enzim Dicer cijepa pre-miRNA, čime nastaju zrele miRNA. Stvaranje sekundarne strukture G-kvadripleksa u pre-miRNA natječe se s formiranjem ukosnice. Na taj način inhibira cijepanje enzimom Dicer, što ukazuje na ulogu G-kvadripleksa u biogenezi i funkciji miRNA. Računalnim metodama pretpostavljeno je postojanje stotine motiva G-kvadripleksa i u različitim zrelim miRNA, no u mnogima njihova biološka funkcija još uvijek nije poznata (Liu i sur. 2020).

## 4. Detekcija G-kvadripleksa u biološkim sustavima

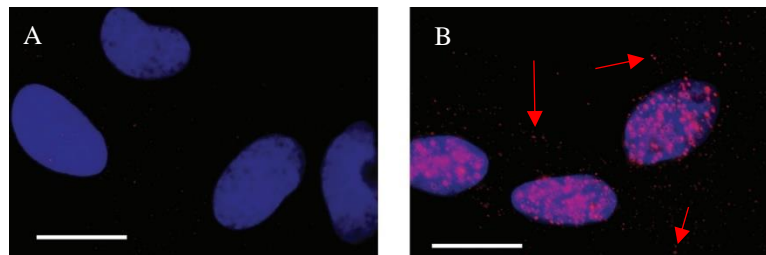
Biofizičke tehnike imaju važnu ulogu u karakterizaciji G-kvadripleksa sintetskih oligonukleotida. Cirkularni dikroizam, krivulja mekšanja pod utjecajem ultraljubičastog (UV) zračenja i spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) najčešće su metode korištene za detekciju i analizu G-kvadripleksa *in vitro*. Osim što je ovim analizama moguće karakterizirati topologiju sintetskih G-kvadripleksa, njima se određuje mogu li biološki RNA i DNA sljedovi tvoriti sekundarne strukture G-kvadripleksa *in vitro* (Fay i sur. 2017).

### 4.1. Detekcija G-kvadripleksa *in vivo*

Kako bi se važnost i prisustvo G-kvadripleksa u biološkim sustavima mogli sa sigurnošću potvrditi, potrebno ih je identificirati *in vivo*. Općenito, za prepoznavanje molekularnih struktura, otkrivanje proteina unutar stanica i za mapiranje njihovih veznih mjesta za DNA ili RNA koriste se antitijela. Korištenjem visokoafinitetnih fragmenata antitijela (Sty3), G-kvadripleksi prvi su puta vizualizirani unutar stanica trepetljikaša *Stylonychia lemnae* imunobojeanjem telomernih G-kvadripleksa (Schaffitzel i sur. 2001). Osim navedenog antitijela specifičnog za telomere, detekcija i lokalizacija G-kvadripleksa u stanicama moguća je korištenjem drugih strukturno-selektivnih molekularnih proba, poput krvnog antigena H1 (BG4) i antitijela 1H6 (Hänsel-Hertsch i sur. 2017). Krvnim antigenom H1 (BG4), specifičnim antitijelom koje se veže za jednolančane nukleinske kiseline, i imunofluorescencijom prvi put su vizualizirani DNA G-kvadripleksi u jezgrama (Slika 10) (Biffi i sur. 2013a) i RNA G-kvadripleksi u citoplazmi ljudskih stanica (Slika 11) (Biffi i sur. 2013b). *In situ* fiksacija jezgre i bojanje navedenim antitijelima pokazuju točkasto obojenje genomske DNA u različitim ljudskim staničnim linijama. Eksperimenti stanične sinkronizacije pokazuju ovisnost staničnog ciklusa o dinamici G-kvadripleksa, pri čemu su G-kvadripleksi najbrojniji u S fazi ciklusa (Hänsel-Hertsch i sur. 2017). Antitijela za G-kvadriplekse ne boje replikacijske rašlje, što znači da strukture G-kvadripleksa moraju biti razriješene tijekom replikacije DNA i telomera. Iako antitijela omogućavaju vizualizaciju G-kvadripleksa u specifičnim dijelovima genoma, njihovo korištenje ne daje informaciju o tome koliki postotak same telomere sadrži G-kvadriplekse (Lipps i Rhodes 2009).



**Slika 10.** Vizualizacija DNA G-kvadripleksa unutar jezgre U2OS stanica pomoću krvnog antigena H1 (BG4) (crveno). Kromosomi su obojani bojom DAPI (plavo), mjerilo 20  $\mu\text{m}$ . **A** – G-kvadripleksi dio su genoma interfazne jezgre. **B, C** – G-kvadripleksi nastaju na različitim dijelovima metafaznih kromosoma. **D, E** – G-kvadripleksi nastaju na telomerama metafaznih kromosoma. Prilagođeno prema Biffi i sur. 2013a.



**Slika 11.** Vizualizacija RNA G-kvadripleksa u citoplazmi SV40-transformiranih MRC5 fibroblasta pomoću krvnog antigena H1 (BG4) (crveno). Kromosomi su obojani bojom DAPI (plavo), mjerilo 20  $\mu\text{m}$ . **A** – jezgre obojane plavom bojom, bez BG4. **B** – dodatak BG4 i vizualizacija RNA G-kvadripleksa izvan područja jezgre. Intenzivnije obojenje naglašeno je crvenom strelicom. Prilagođena prema Biffi i sur. 2013b.

Osim detekcije antitijelima, za identifikaciju G-kvadripleksa koriste se i male sintetske molekule (ligandi), poput PDS $\alpha$  koji predstavlja derivat piridostatina (PDS, eng. *pyridostatin*). Nakon dodatka liganda PDS $\alpha$  i fiksacije stanica u formaldehidu, vezivanje fluorofora na ligand omogućava detekciju G-kvadripleksa (Hänsel-Hertsch i sur. 2017). Ova metoda potvrdila je prisutnost G-kvadripleksa u telomerama različitih organizama, uključujući i kralješnjake (Lipps i Rhodes 2009).

Mapiranje genoma metoda je koja kombinira G4-ovisno zaustavljanje DNA-polimeraze i sekvenciranje iduće generacije (*G4-seq*), čime se dobiva mapa G-kvadripleksa za cijeli genom u pročišćenoj jednolančanoj ljudskoj molekuli DNA. Genomska DNA izolira se iz stanica u uvjetima koji ne favoriziraju formaciju G-kvadripleksa, nakon čega se rekvenciraju u uvjetima koji stabiliziraju kvadriplekse, poput dodatka kalijevih kationa ili molekule PDS. G4-ovisno zaustavljanje polimeraze detektira se u reakciji rekvenciranja pomoću nagle redukcije kvalitete sekvenciranih podataka u odnosu na prvo sekvenciranje. Podaci smanjene kvalitete predstavljaju područja u sekvenciranom genomu u kojima je došlo do stvaranja G-kvadripleksa. Mapiranjem genoma potvrđene su veće količine struktura G-kvadripleksa u

regulacijskim regijama gena, poput promotora, 5'-netranslatiranih regija (5'-UTR), te pojačanu ekspresiju struktura G-kvadripleksa u genima povezanim s rakom (Hänsel-Hertsch i sur. 2017).

## 4.2. Računalna detekcija G-kvadripleksa

S obzirom da motivi G-kvadripleksa imaju bitnu ulogu u regulaciji staničnih procesa, važno je znati njihovu točnu lokaciju unutar genoma. Prvi algoritam stvoren za određivanje dijelova genoma u kojima bi se potencijalno mogle tvoriti strukture G-kvadripleksa pretražuje motive oblika  $[G_n N_m G_n N_o G_n N_p G_n]$  unutar analiziranog slijeda ili analiziranog genoma, pri čemu „G“ označava bazu gvanin, „N“ bilo koju dušičnu bazu, a slova u indeksu broj ponavljanja navedene baze (Huppert i Balasubramanian 2005). Jednostavnim algoritmom oblika  $[G_{\geq 3} N_{1-7} G_{\geq 3} N_{1-7} G_{\geq 3} N_{1-7} G_{\geq 3}]$  predviđeno je postojanje više od 300 000 navedenih motiva koji mogu tvoriti G-kvadriplekse unutar ljudskog genoma. Navedeni algoritam potvrđuje obilje G-kvadripleksa u telomerama, promotorima gena i u prvom intronu gena (Hänsel-Hertsch i sur. 2017). Međutim, ovi algoritmi daju isključivo binarne (da/ne) rezultate umjesto kvantitativnih analiza obveznih za korelaciju mogućnosti stvaranja kvadripleksa s ostalim genomskim ili funkcionalnim parametrima. Za prevladavanje ovih ograničenja, stvoren je algoritam G4Hunter. Algoritam uzima u obzir „G-bogatstvo“ (udio gvanina u slijedu, eng. *G-richnes*) i „G-iskrivljenost“ (asimetrija G/C baza između komplementarnih lanaca, eng. *G-skewness*), a kao izlazni podatak daje vrijednost koja predstavlja sklonost slijeda stvaranju G-kvadripleksa (Bedrat 2015, Bedrat i sur. 2016).



## 5. Interakcija G-kvadripleksa s malim molekulama

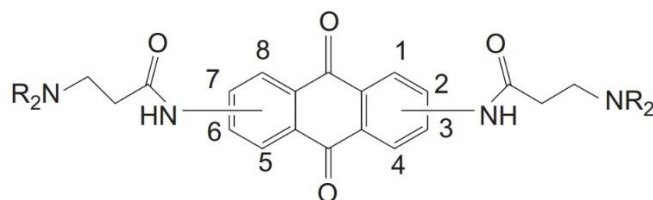
Širok spektar od oko 1000 malih molekula ili liganda može tvoriti interakcije s G-kvadripleksima. Ligandi sadrže nekoliko zajedničkih karakteristika, poput planarne aromatske strukture i pozitivno nabijenih postranih lanaca. Planarna aromatska srž liganda omogućava interakcije slaganja s planarnim G-kvartetima, dok se pozitivno nabijeni lanac selektivno veže za petlje ili utore kvadripleksa (Sanchez-Martin i sur. 2021). Za precizno određivanje strukture i interakcija u kompleksu G-kvadripleksa i njegova liganda koriste se visoko-rezolucijske tehnike kristalografije X-zrakama i spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) (Haider i sur. 2011).

G-kvadripleksi prisutni u telomerama onemogućuju vezivanje telomerase i produljivanje telomera. Kako je u 80-85 % ljudskih stanica raka značajna ekspresija enzimske aktivne telomerase, male molekule koje stabiliziraju telomerne G-kvadriplekse potencijalni su antitumorski lijekovi (Neidle 2012). Osim u samim telomerama, novija istraživanja okrenuta su pokušajima transkripcijske modulacije pojedinih tumorskih gena ciljajući G-kvadriplekse u njihovim sljedovima (Sanchez-Martin i sur. 2021). Primjerice, ligandi koji stabiliziraju G-kvadriplekse u promotorskim sljedovima mogu omogućiti transkripcijsku regulaciju ekspresije onkogeni (Haider i sur. 2011)

### 5.1. Primjeri liganda G-kvadripleksa

Za velik broj liganda koji vežu G-kvadriplekse otkriven je antitumorski utjecaj na stanice. Neki od njih su disupstituirani amidoantrakvinoni, TMPyP4, adriamicin, berberin, nitidin, disupstituirani akridini i sintetski fluorokvinoloni. Njihova učinkovitost i specifičnost najčešće se određuju na G-kvadripleksima prisutnim u telomerama ili promotorima gena *c-MYC*, *k-RAS* i *c-KIT* (Sanchez-Martin i sur. 2021).

Disupstituirani amidoantrakvinoni (eng. *disubstituted amido-anthraquinone*) (Slika 12) prvi su zabilježeni ligandi G-kvadripleksa. Snažno se vežu za telomerne G-kvadriplekse i blokiraju aktivnost telomerase na način da onemogućavaju sparivanje baza između jednolančane telomerne regije i RNA regije enzima (Sun i sur. 1997). Problem većine amidoantrakviona koji inhibiraju aktivnost telomerase leži u njihovoj generalnoj toksičnosti za stanicu (Neidle 2012).



**Slika 12.** Općenita struktura disupstituiranih amidoalkilamino antrakvinona. Preuzeto iz Neidle 2012.

Kationski porfirin TMPyP4 inhibira aktivnost telomeraze vezivanjem za telomerne G-kvadriplekse. Može se koristiti i kod kvadripleksa u promotorima onkogeni, poput *c-MYC*, *BCL2* i *k-RAS*. Međutim, prepreka u korištenju TMPyP4 u terapijske svrhe jest njegova sposobnost vezivanja i dvolančane i trolančane DNA, osim samih kvadripleksa (Sanchez-Martin i sur. 2021).

Pojedini sintetski ligandi G-kvadripleksa došli su i do kliničkih ispitivanja. CX-3543 ili kvarfloksin (eng. *quarfloxin*) je fluorokvinolon (eng. *fluoroquinolone*) dizajniran kako bi ciljao kvadriplekse u promotoru gena *c-MYC*. Iako je došao do druge faze kao kandidat u liječenju nekoliko tipova tumora, treća faza nije dovršena zbog njegovog velikog afiniteta prema albuminu. Drugi fluorokvinolon, CX-5461, selektivno veže i stabilizira širok spektar G-kvadripleksa, poput onih u promotoru gena *c-MYC* i u telomerama. CX-5461 trenutno je u prvoj fazi kliničkog ispitivanja za pacijente s tumorima uzrokovanim mutacijama u genima *BRCA1/2* (Sanchez-Martin i sur. 2021).

Disupstituirani akridini stabiliziraju G-kvadriplekse i mogu inhibirati aktivnost telomeraze pri niskim mikromolarnim ( $\mu\text{M}$ ) koncentracijama. Međutim, srž poliaromatskog prstena akridina ima visoki afinitet za interkalaciju s dvolančanom DNA, i njegova je selektivnost niska (Neidle 2012).

## 6. G-kvadripleksi u prokariotskim i virusnim genomima

Genetski materijal prokariota većinom je pohranjen u kružnom kromosomu i plazmidima, a sekundarna struktura prokariotskog genoma odgovorna je za njegovu stabilnost (Bartas i sur. 2019). Sama prisutnost i funkcija G-kvadripleksa u prokariotskim DNA i mRNA još uvijek se slabo razumije. Prokariotski genomi bogati su G4 motivima u regulacijskim sljedovima otvorenih okvira čitanja (ORFs, eng. *open reading frames*). Učestalost G4 motiva veća je unutar promotora gena povezanih s transkripcijom, biosintezom sekundarnih metabolita i prijenosom signala. Temeljem toga, smatra se da DNA u obliku G-kvadripleksa predstavlja regulacijski stanični signal. Računalne analize genoma bakterija pokazuju da bakterije čiji genom sadrži veći udio GC parova baza sadrže i veći broj potencijalnih G4 motiva, a očuvanost motiva u promotorima ortolognih gena različitih vrsta ukazuje na očuvanost G4 motiva u filogenetički udaljenim organizmima (Shao i sur. 2020).

Virusi su unutarstanični paraziti koji za svoje umnažanje iskorištavaju staničnu replikacijsku mašineriju i mašineriju za sintezu proteina. Prema Baltimoreovoj klasifikaciji, mogu se podijeliti u 7 skupina, ovisno o tipu genoma i mehanizmu replikacije: DNA virusi s 1) dvolančanim i 2) jednolančanim genomom; RNA virusi s 3) dvolančanim genomom, ili jednolančanim genomom s 4) pozitivnom (ssRNA (+)) ili 5) negativnom (ssRNA (-)) polarnošću; 6) RNA ili 7) DNA virusi s mogućnošću reverzne transkripcije (RT). G-kvadripleksi dio su genoma gotovo svih Baltimoreovih skupina ljudskih virusa, a njihova prisutnost određena je računalnim analizama. U dvolančanoj DNA grupi, G-kvadripleksi su opisani u obiteljima *Herpesviridae* i *Papillomaviridae*, dok su u jednolančanim DNA virusima opisani u adeno-povezanim virusnim genomima. RNA G-kvadripleksi opisani su u jednolančanim RNA genomima s pozitivnom (Zika, hepatitis C virus (HCV), koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS koronavirus)) i negativnom (Ebola virus) polarnošću. G-kvadripleksi prisutni su i u genomu hepatitis B virusa (HBV), jedinog predstavnika dvolančanih DNA virusa s aktivnošću reverzne transkriptaze, te u genomu humanog imunodeficijencijskog virusa (HIV), predstavnika dvolančanih RNA virusa s aktivnošću reverzne transkriptaze (Lavezzo i sur. 2018).

## 7. Zaključak

Sekundarna struktura nukleinskih kiselina, G-kvadripleksi, važan je dio genoma eukariota, prokariota i virusa. U genomima eukariota DNA G-kvadripleksi pronalaze se u telomerama i u promotorskim regijama. Važan su dio nekodirajućih i kodirajućih RNA molekula. U glasničkoj RNA pronalaze se u 5'- i 3'-netranslatiranim regijama i u intronima. Pozicija G-kvadripleksa unutar genoma određuje njegovu funkciju. Kao dio telomera, DNA G-kvadripleksi imaju važnu ulogu u održavanju njihove stabilnosti i u regulaciji aktivnosti enzima telomerase. Svojom strukturom utječu na ekspresiju gena, bilo na razini transkripcije, translacije, poliadenilacije ili prekrajanja. Specifičnost građe G-kvadripleksa omogućava njegovu interakciju s malim molekulama. Danas se mnogi potencijalni antitumorski lijekovi pronalaze među ligandima koji stabiliziraju strukture G-kvadripleksa.

## 8. Literatura

Agarwala, P., Pandey, S., Maiti, S. (2015): The tale of RNA G-quadruplex. *Organic & Biomolecular Chemistry* 13 (20): 5570–5585.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015): *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.

Bartas, M., Čutová, M., Brázda, V., Kaura, P., Šťastný, J., Kolomazník, J., Coufal, J., Goswami, P., Červen, Pečinka, P. (2019): The Presence and Localization of G-Quadruplex Forming Sequences in the Domain of Bacteria. *Molecules*, 24 (9): 1711.

Bedrat, A. (2015): G4-Hunter: a new algorithm for G-quadruplexes prediction's. *Human genetics*. Université de Bordeaux, Bordeaux.

Bedrat, A., Lacroix, L., Mergny, J.-L. (2016): Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Research*, 44(4): 1746–1759.

Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2013): *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb.

Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., Balasubramanian, S. (2013a): Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nature Chemistry*, 5 (3): 182–186.

Biffi, G., Di Antonio, M., Tannahill, D., Balasubramanian, S. (2013b). Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nature Chemistry*, 6 (1): 75–80.

Bryan, T. M. (2020): G-Quadruplexes at Telomeres: Friend or Foe? *Molecules*, 25(16): 3686.

Cesare Marincola, F., Virno, A., Randazzo, A., Mocci, F., Saba, G., Lai, A. (2009): Competitive binding exchange between alkali metal ions ( $K^+$ ,  $Rb^+$ , and  $Cs^+$ ) and  $Na^+$  ions bound to the dimeric quadruplex  $[d(G_4T_4G_4)]_2$ : a  $^{23}Na$  and  $^1H$  NMR study. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47(12): 1036–1042.

Chan, K. L., Peng, B., Umar, M. I., Chan, C. Y., Sahakyan, A. B., Le, M. T. N., Kwok, C. K. (2018): Structural analysis reveals formation and role of RNA G-quadruplex structures in human mature microRNAs. *Chemical Communications*, 54: 10878-10881.

- Chatterjee, S., Pal, J. K. (2009): Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell*, 101 (5): 251–262.
- Chen, Y., Yang, D. Z. (2012): Sequence, stability, and structure of G-quadruplexes and their interactions with drugs. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 50:17.15.11–17.15.17.
- Eddy, J., Maizels, N. (2006): Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Research* 34 (14): 3887–3896.
- Fay, M. M., Lyons, S. M., Ivanov, P. (2017): RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *Journal of Molecular Biology* 429(14): 2127–2147.
- Forman, S. L., Fetting, J. C., Pieraccini, S., Gottarelli, G., Davis, J. T. (2000): Toward artificial ion channels: a lipophilic G-quadruplex. *Journal of the American Chemical Society* 122(17): 4060–4067.
- Gellert, M., Lipsett, M. N., Davies, D. R. (1962): Helix formation by guanylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 48(12): 2013–2018.
- Gong, J., Wen, C., Tang, M., Duan, R., Chen, J., Zhang, J., Zheng, K., de He, Y., Hao, Y., Ren, S., Tan, Z. (2021): G-quadruplex structural variations in human genome associated with single-nucleotide variations and their impact on gene activity. *PNAS* 118(21): e2013230118.
- Haider, S., Parkinson, G. N., Neidle, S. (2002). Crystal structure of the potassium form of an *Oxytricha nova* G-quadruplex. *Journal of Molecular Biology* 320(2): 189–200.
- Haider, S. M., Neidle, S., Parkinson, G. N. (2011): A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions. *Biochimie*, 93(8): 1239–1251.
- Hänsel-Hertsch, R., Di Antonio, M., Balasubramanian, S. (2017): DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18 (5): 279–284.
- Huppert, J. L., Balasubramanian, S. (2005): Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Resources*. 33: 2908–2916.
- Huppert, J. L., Balasubramanian, S. (2006): G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research* 35(2): 406–413.
- Huppert, J. L., Bugaut, A., Kumari, S., Balasubramanian, S. (2008): G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Research*, 36 (19): 6260–6268.

- Ida, R., Kwan, I. C. M., & Wu, G. (2007): Direct  $^{23}\text{Na}$  NMR observation of mixed cations residing inside a G-quadruplex channel. *Chemical Communication Journal* (8): 795–797.
- Kumari, S., Bugaut, A., Huppert, J. L., Balasubramanian, S. (2007): An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nature Chemical Biology*, 3 (4): 218–221.
- Kwok, C. K., Marsico, G., Balasubramanian, S. (2018): Detecting RNA G-quadruplexes (rG4s) in the transcriptome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7): a032284.
- Larsen, A., Weintraub, H. (1982): An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin. *Cell* 29(2):609–622.
- Lavezzo, E., Berselli, M., Frasson, I., Perrone, R., Palù, G., Brazzale, A. R., Richter, S. N., Toppo, S. (2018): G-quadruplex forming sequences in the genome of all known human viruses: A comprehensive guide. *PLOS Computational Biology*, 14(12), e1006675.
- Lee, M. P. H., Parkinson, G. N., Hazel, P., Neidle, S. (2007): Observation of the coexistence of sodium and calcium ions in a DNA G-quadruplex ion channel. *Journal of the American Chemical Society* 129(33): 10106–10107.
- Lipps, H. J., Rhodes, D. (2009): G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in Cell Biology* 19(8): 414–422.
- Liu, G., Du, W., Xu, H., Sun, Q., Tang, D., Zou, S., Zhang, Y., Ma, M., Zhag, G., Du, X., Ju, S., Cheng, W., Tian, Y., Fu, X. (2020): RNA G-quadruplex regulates microRNA-26a biogenesis and function. *Journal of Hepatology*, 73 (2): 371 – 382.
- Marcel, V., Tran, P. L. T., Sagne, C., Martel-Planche, G., Vaslin, L., Teulade-Fichou, M.-P., Hall, J., Mergny, J.-L., Hainaut, P., Van Dyck, E. (2010): G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis*, 32(3): 271–278.
- Neidle, S (2012): *Therapeutic applications of quadruplex nucleic acids*. Elsevier, SAD.
- O'Sullivan, R. J., Karlseder, J. (2010): Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(3): 171–181.

- Patel, D. J., Phan, A. T., Kuryavyi, V. (2007): Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Research* 35(22): 7429–7455.
- Pelengaris, S., Khan, M., Evan, G. (2002): c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer* 2(10): 764–776.
- Phan, A. T. (2009): Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences. *FEBS Journal* 277(5): 1107–1117.
- Popenda, M., Miskiewicz, J., Sarzynska, J., Zok, T., Szachniuk, M. (2020): Topology-based classification of tetrads and quadruplex structures. *Bioinformatics* 36(4): 1129-1134.
- Ralph, R. K., Connors, W. J., Khorana, H. G. (1962): Secondary structure and aggregation in deoxyguanosine oligonucleotides. *Journal of the American Chemical Society* 84 (11): 2265-2266.
- Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., Schönbach, C. (2019): *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology*. Elsevier, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- Ribeiro, M. M., Teixeira, G. S., Martins, L., Marques, M. R., de Souza, A. P., Line, S. R. P. (2014): G-quadruplex formation enhances splicing efficiency of PAX9 intron 1. *Human Genetics* 134(1): 37–44.
- Sanchez-Martin, V., Soriano, M., Garcia-Salcedo, J. A. (2021): Quadruplex ligands in cancer therapy. *Cancers*, 13 (13): 3156.
- Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H. J., Pluckthun, A. (2001): *In vitro* generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylomychia lemnae* macronuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (15): 8572–8577.
- Shao, X., Zhang, W., Umar, M. I., Wong, H. Y., Seng, Z., Xie, Y., Zhang, Y., Yang, L., Kwork, C. K., Deng, X. (2020): RNA G-quadruplex structures mediate gene regulation in bacteria. *mBio*, 11(1).
- Sen, D., Gilbert, W. (1988): Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334: 364–366.



- Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J., Hurley, L. H. (2002): Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *PNAS* 99(18):11593–11598.
- Srinivas, N., Rachakonda, S., Kumar, R. (2020): Telomeres and telomere length: a general overview. *Cancers* 12(3): 558.
- Subramanian, M., Rage, F., Tabet, R., Flatter, E., Mandel, J.-L., Moine, H. (2011). G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Reports* 12(7): 697–704.
- Sun, D., Thompson, B., Cathers, B. E., Salazar, M., Kerwin, S. M., Trent, J. O., Jenkins, T. C., Neidle, S., Hurley, L. H. (1997): Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *Journal of medicinal chemistry*, 40 (14): 2113–2116.
- Sundquist, W.I., Klug, A. (1989): Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342: 825–829.
- Trybek, T., Kowalik, A., Gózdź, S., Kowalska, A. (2020): Telomeres and telomerase in oncogenesis. *Oncogenetic Letters* 20(2): 1015-1027.
- Verma, S. P., Das, P. (2018): Novel splicing in IGFN1 intron 15 and role of stable G-quadruplex in the regulation of splicing in renal cell carcinoma. *PLOS ONE*, 13(10): e0205660.
- Williamson, J. R., Raghuraman, M. K., Cech, T. R. (1989): Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* 59: 871–880.
- Wood, W. I., Felsenfeld, G. (1982): Chromatin structure of the chicken beta-globin gene region. Sensitivity to DNase-I, micrococcal nuclease, and DNase-II. *Journal of Biological Chemistry*, 257 (13): 7730–7736.
- Yang, D., Hurley, L. H. (2006): Structure of the biologically relevant G-quadruplex in the c-MYC promoter. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 25(8): 951–968.
- Yang, D., Lin, C. (2019): *G-Quadruplex Nucleic Acids, Methods and Protocols*. Humana Press, New York.

## 9. Životopis

Dora Kermek rođena je 18. ožujka 2001. godine u Čakovcu. Završila je prirodoslovno-matematički smjer Prve gimnazije u Varaždinu kao najbolja maturantica škole i Varaždinske županije. Preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala je 2019. godine. Tijekom studija sudjeluje u organizaciji edukativnih radionica za nadarenu djecu u Udruzi Bioteka i provedbi manifestacije *Noć u muzeju* u Prirodoslovnom muzeju u Zagrebu. Sudjelovala je kao aktivni izlagač na *3. dinarskom simpoziju o podzemnoj biologiji* (Trebinje, 2022), *Simpoziju studenata bioloških usmjerenja* (Zagreb, 2022) i *Međunarodnoj konferenciji o DNA barkodiranju i bioraznolikosti* (Sofia, 2022). Od 2021. godine članica je Udruge studenata biologije – BIUS te iste godine postaje voditeljicom Sekcije za biospeleologiju.