

Introni

Zanki, Vladimir

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

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:217:117968>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

INTRONI

INTRONS

ZAVRŠNI RAD

Vladimir Zanki

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

(Undergraduate study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2014.

Rad je izrađen na Zavodu za Biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

OCJENA ZAVRŠNOG RADA:

Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

POPIS KRATICA

A	adenin, engl. <i><u>a</u>denine</i>
ADP	adenozin-difosfat, engl. <i><u>a</u>denosine <u>d</u>iphosphate</i>
ATP	adenozin-trifosfat, engl. <i><u>a</u>denosine <u>t</u>riphosphate</i>
C	citozin, engl. <i><u>c</u>ytosine</i>
CoA	koenzim A, engl. <i><u>c</u>oenzyme <u>A</u></i>
CTP	citidin-trifosfat, engl. <i><u>c</u>ytidine <u>t</u>riphosphate</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, engl. <i><u>d</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
G	gvanin, engl. <i><u>g</u>uanine</i>
GDP	gvanozin-difosfat, engl. <i><u>g</u>uanosine <u>d</u>iphosphate</i>
GMP	gvanozin-monofosfat, engl. <i><u>g</u>uanosine <u>m</u>onophosphate</i>
GTP	gvanozin-trifosfat, engl. <i><u>g</u>uanosine <u>t</u>riphosphate</i>
mRNA	glasnička RNA, engl. <i><u>m</u>essenger RNA</i>
N	bilu koja baza, A, G, C ili U
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid, engl. <i><u>n</u>icotinamide <u>a</u>denine <u>d</u>inucleotide</i>
R	purinska baza, A ili G
RNA	ribonukleinska kiselina, engl. <i><u>r</u>ibo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
rRNA	ribosomska RNA, engl. <i><u>r</u>ibosomal RNA</i>
snRNA	mala jezgrina RNA, engl. <i><u>s</u>mall <u>n</u>uclear RNA</i>
snRNP	male jezgrine ribonukleoproteinske čestice, engl. <i><u>s</u>mall <u>n</u>uclear <u>r</u>ibo<u>n</u>ucleoprotein particles, snurpovi</i>
snoRNP	male jezgrične ribonukleoproteinske čestice, engl. <i><u>s</u>mall <u>n</u>ucleolar <u>r</u>ibo<u>n</u>ucleoprotein particles</i>
T	timin, engl. <i><u>t</u>hymine</i>
tRNA	prijenosna RNA, engl. <i><u>t</u>ransfer RNA</i>
tRNA ^{Tyr}	tirozinska tRNA
U	uracil, engl. <i><u>u</u>racil</i>
Y	pirimidinska baza, C ili U
YSPTSPS	tirozin-serin-prolin-treonin-serin-prolin-serin

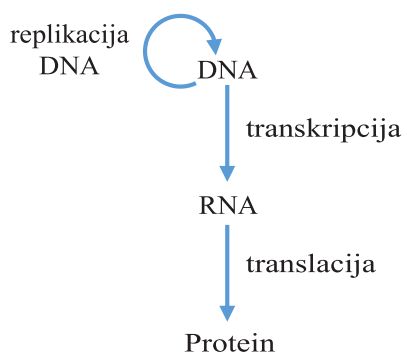
SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. MOLEKULARNA OSNOVA ŽIVOTA	3
3. INTRONI.....	6
3.1. Otkriće introna.....	7
3.2. Mehanizmi izrezivanja introna	8
3.2.1. Izrezivanje spliceosomskih introna	9
3.2.2. Samoizrezivanje introna grupe II	14
3.2.3. Samoizrezivanje introna grupe I	14
3.2.4. Izrezivanje introna iz pred-tRNA.....	16
3.2.5. AT-AC introni	17
3.3. Alternativno prekranje molekula pred-mRNA	20
3.3.1. Alternativno prekranje α -tropomiozinske pred-mRNA	21
3.3.2. Alternativno prekranje kalcitonin/CGRP pred-mRNA	22
3.3.3. Determinacija spola kod vinske mušice <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen.....	23
3.3.4. Trans-izrezivanje	25
3.4. Mutacije povezane s procesom izrezivanja introna	26
3.5. Evolucija introna.....	27
4. ZAKLJUČAK	30
5. LITERATURA.....	31
6. SAŽETAK	34
7. SUMMARY	34

1. UVOD

Život se temelji na sposobnosti stanice da primi, pohrani i obradi genetičku informaciju. Nasljedna uputa, zapisana kao slijed nukleotida u molekuli DNA, prenosi se s roditeljske stanice na stanicu kćer prilikom svake diobe stanice, te s jedne generacije na iduću prilikom reprodukcije (Alberts i dr., 2007). Upravo stoga, replikacija DNA mora se dogoditi svaki put prije nego će stanica proizvesti identičnu stanicu kćer.

Informacija za RNA produkt ili protein sadržana je u molekuli DNA u obliku gena, odnosno slijeda nukleotida. Prijepis informacije s molekule DNA na novosintetiziranu molekulu RNA naziva se transkripcija pri čemu nastaje primarni transkript, odnosno pred-RNA. Kod prokariotskih organizama sintezu primarnog transkripta vrši jedna RNA-polimeraza, dok kod eukariotskih organizama postoje tri različita tipa RNA-polimeraza. Djelovanjem RNA-polimeraze I kod eukariota nastaje pred-rRNA koja će se posttranskripcijskom doradbom doraditi u zrelu molekulu rRNA. Zrela molekula rRNA, zajedno s proteinima, izgrađuje velike ribonukleoproteinske komplekse, ribosome, na kojima se odvija biosinteza proteina. Djelovanjem RNA-polimeraze II nastaje jedna monocistronska molekula pred-mRNA iz koje će posttranskripcijskim modifikacijama nastati zrela mRNA. Zrela molekula mRNA, s uputom za sintezu proteina, odlazi u citoplazmu i na ribosomima sudjeluje u biosintezi proteina, u procesu koji se naziva translacija. I naposljetku, djelovanjem RNA-polimeraze III nastaju pred-tRNA koje se posttranskripcijskom doradbom dorađuju u zrele molekule tRNA. Njihova osnovna uloga je prijenos odgovarajuće aminokiseline na ribosom prilikom biosinteze proteina. U eukariotskoj stanici može se pronaći još različitih molekula RNA, kao što su male jezgrine RNA (snRNA), molekule mikro-RNA (miRNA) ili molekule male-interferirajuće-RNA (siRNA). Svi stanični organizmi, od bakterija do ljudi, koriste isti fundamentalni mehanizam za prijenos genetičke informacije i on predstavlja



Slika 1. Centralna dogma molekularne biologije

Centralna dogma povezuje replikaciju DNA zajedno s transkripcijom i translacijom. Prilagođeno prema Nelson i dr., 2008.

centralnu dogmu molekularne biologije (Slika 1.) (Alberts i dr., 2007; Nelson i Cox, 2008; Berg i dr., 2013).

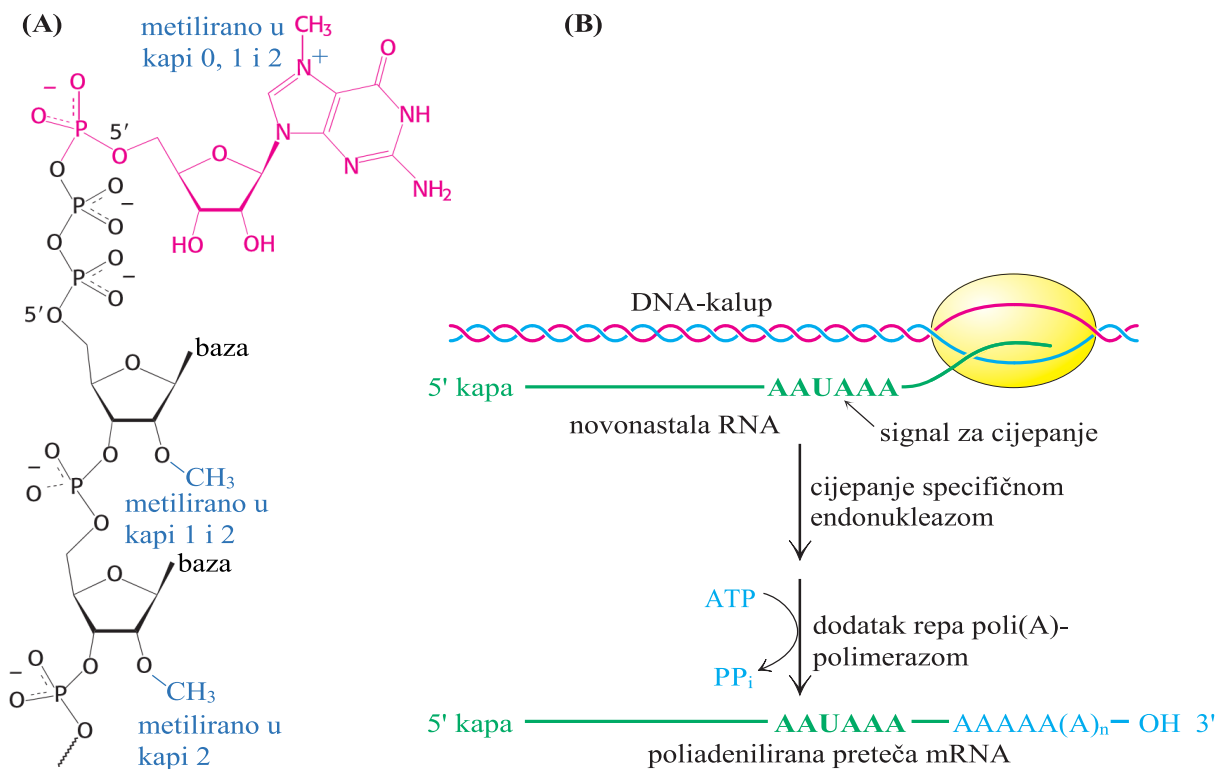
Unatoč univerzalnosti centralne dogme, postoje važne varijacije u putu kojim se informacija prenosi s DNA na protein ili RNA produkt. Primarni transkript RNA u eukariotskim stanicama podložen je velikom broju procesiranja unutar jezgre, uključujući procesiranje 5'-kraj i 3'-kraja, izrezivanje introna i ponekad promjenu nukleotida, prije nego mu je omogućen odlazak u citoplazmu gdje će se translatirati u protein. Ta procesiranja mogu promijeniti osnovno značenje molekule RNA i stoga su od fundamentalnog značaja za razumijevanje kako eukariotska stanica čita svoj genom. Introni, kao nekodirajući dijelovi DNA, često predstavljaju velika mjesta u genomu gdje može doći do izmjene genetičkog materijala ili čak mutacija bez neposredne opasnosti za sam gen, odnosno protein. Izrezivanje introna iz primarnih transkripata jedan od fundamentalnih biokemijskih procesa eukariotske stanice, a alternativno prekrajanje molekula RNA predstavlja jedan od osnovnih izvora proteinske raznolikosti eukariotskog organizma (Alberts i dr., 2007; Nelson i Cox, 2008; Berg i dr., 2013).

2. MOLEKULARNA OSNOVA ŽIVOTA

Gen je dio molekule DNA, zapisan kao slijed nukleotida, koji sadrži uputu za sintezu molekule RNA ili proteina. Transkripcija je jedan od osnovnih biokemijskih procesa i događa se unutar svake žive stanice. Djelovanjem posebnog enzima, RNA-polimeraze, stvara se novi polinukleotidni lanac komplementaran kodirajućem lancu DNA, primarni transkript. Primarni transkript je zapravo molekula RNA koja ima višestruke uloge. Nakon posttranskripcijske doradbe, zrela RNA može sudjelovati u građi ribosoma, u obliku rRNA, može nositi uputu za sintezu polipeptidnog lanca, kao mRNA, može sudjelovati u biosintezi proteina, kao tRNA, ili može pak imati regulacijske i druge uloge. Molekule RNA sudjeluju također u građi kompleksa za prekrajavanje te u samom procesu izrezivanja introna, što je opisano u odjeljku 3.2.1.

U procesu transkripcije RNA-polimeraza I stvara jednu jedinstvenu molekulu RNA (45S u sisavaca) iz koje nastaju tri ribosomske RNA: 18S rRNA, 28S rRNA i 5.8S rRNA. Prije cijepanja preteče u tri odvojene molekule rRNA znatno se modificiraju nukleotidi i riboze pod djelovanjem snoRNP-ova. Malu ribosomsku podjedinicu (40S) izgrađuje 18S rRNA, dok u građi velike ribosomske podjedinice (60S) sudjeluju 5.8S rRNA i 28S rRNA zajedno s 5S rRNA koju transkribira RNA-polimeraza III kao nezavisan transkript. Cijepanjem modificirane molekule pred-rRNA nastaju zrele rRNA povezane s proteinima i čine ribosomske podjedinice (Berg i dr., 2013).

Djelovanjem RNA-polimeraze II nastaju molekule pred-mRNA. Odmah na početku transkripcije, nakon što je dodano 20 do 30 nukleotida, dolazi do modifikacije njenog 5'-trifosfatnog kraja (Nelson i Cox, 2008). Hidrolizom se otpušta fosforilna skupina te difosfat na 5'-kraju napada α -fosforov atom molekule GTP i nastaje 5'-5' trifosfatna veza. Ovako modificirani 5'-kraj molekule pred-mRNA naziva se kapom (Slika 2.A). Kape doprinose stabilnosti mRNA štiteći njihove 5'-krajeve od djelovanja fosfataza i nukleaza te povećavaju translabilnost mRNA eukariotskim sustavom za sintezu proteina. Primarni transkripti se potom cijepaju specifičnim endonukleazama koje prepoznaju specifičan slijed AAUAAA. Nakon cijepanja i završetka transkripcije dolazi do modifikacije 3'-kraja (Berg i dr., 2013). Poli(A)-polimeraza dodaje između 80 do 250 nukleotidnih (Nelson i Cox, 2008) ostataka na 3'-kraj, gdje je ATP donor adenilata, pri čemu nastaje dugački poliadenilatni, poli(A) rep (Berg i dr., 2013). Ovaj enzim ne zahtjeva kalup za sintezu, ali zahtjeva porezanu mRNA koja služi kao početnica (Slika 2.B) (Nelson i Cox, 2008). Poli(A) rep povećava efikasnost translacije kao i samu stabilnost mRNA (Berg i dr., 2013).

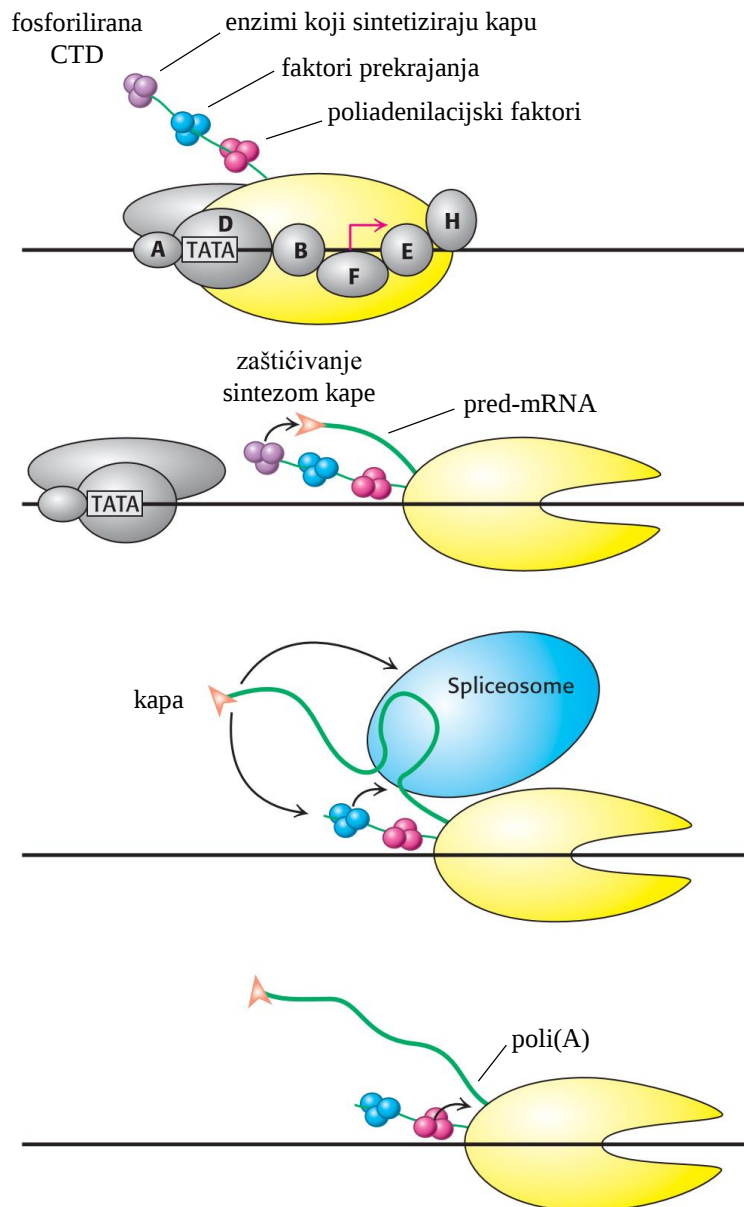


Slika 2. Zaštićivanje 5' i 3' kraja

(A) Zaštita (kapa) na 5'-kraju eukariotske mRNA uključuje 7-metilgvanilat (crveno) vezan trifosfatnom vezom na 5'-kraj riboze. U kapi 0 riboze nisu metilirane, jedna je metilirana u kapi 1, a obje u kapi 2.

(B) Specifična endonukleaza cijepa RNA nizvodno od AAUAAA, a potom poli(A)-polimeraza dodaje oko 250 adenilatnih ostataka (Berg i dr., 2013).

Transkripcija i posttranskripcijska doradba pred-mRNA su povezani procesi koje usklađuje karboksi-terminalna domena (CTD) RNA-polimeraze II. CTD sadržava jedinstveni slijed od sedam aminokiselina, YSPTSPS, koji se ponavlja više od 10 puta, gdje se serini S₂ ili S₅ ili oba mogu fosforilirati, pri čemu je fosforilacijsko stanje kontrolirano kinazama i fosfatazama. CTD privlači enzime za metilaciju 5'-gvanina pred-mRNA neposredno nakon početka transkripcije, privlači komponente sustava za prekrajanja koji izrezuju svaki intron odmah nakon njegove sinteze i privlači endonukleaze koja cijepa transkript stvarajući slobodnu 3'-OH skupinu za adenilaciju (Slika 3.). Svi ovi događaji zbivaju se postupno, a kontrolira ih fosforilacijsko stanje CTD-a (Berg i dr., 2013).



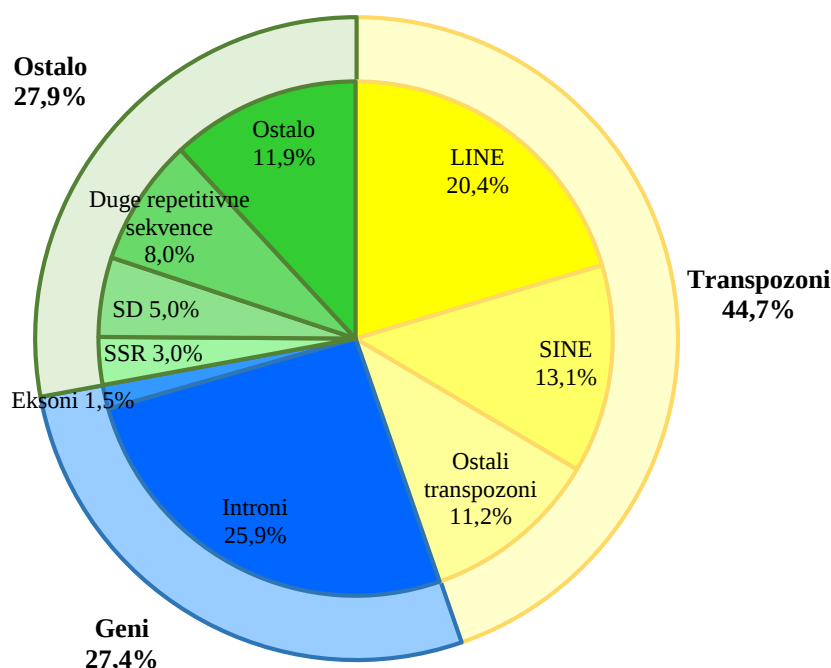
Slika 3. CTD povezuje transkripciju s pred-mRNA doradbom

Transkripcijski faktor TFIIF fosforilira CTD RNA-polimeraze II i tako signalizira prelazak iz inicijacijske u elongacijsku fazu transkripcije. Fosforilirana CTD veže faktore potrebne za sintezu kape, prekrajanje i poliadenilaciju (Berg i dr., 2013).

Rezultat djelovanja RNA-polimeraze III je pred-tRNA molekula iz koje nastaju zrele tRNA molekule čija je glavna uloga prijenos aktivirane aminokiseline do ribosoma. Za svaku od 20 aminokiselina postoji barem jedna vrsta tRNA, koje u pravilu sadržavaju oko 75 nukleotida i imaju masu od oko 25 kDa (podaci se odnose na tRNA bakterije *Escherichia coli*) (Nelson i Cox, 2008).

3. INTRONI

Prokariotski organizmi sadrže samo jedan kromosom po stanici koji u pravilu sadrži jednu kopiju svakog gena. Samo manji broj gena dolazi u više kopija u genomu, kao što su primjerice geni za ribosomske RNA. Kod gotovo svih gena slijed nukleotida u genu odgovara slijedu nukleotida u RNA, odnosno slijedu aminokiselina u proteinu koji je kodiran tim genom (Nelson i Cox, 2008). Genom eukariotskih organizama je strukturno i funkcionalno mnogo kompliciraniji. Nukleotidni slijedovi gotovo svih gena eukariotskog kromosoma ne odgovaraju u potpunosti nukleotidnom slijedu u RNA za koju kodiraju, a samim time ni aminokiselinskoj sekvenci (Alberts i dr., 2007). Eukariotski geni su razlomljeni jer sadrže nukleotidne slijedove koji ne postoje u zrelih RNA. To je potaknulo zanimljivu raspravu o tome što se događa s dijelom primarnog transkripta koji se na neki način izgubio između transkripcije i translacije te zbog čega se taj dio uopće izgubio. A jedno od najzanimljivijih pitanja je bilo zašto bi organizam u svom genomu čuvao informacije koje mu, prema tadašnjem mišljenju, nisu potrebne te ih kasnije izrezao. Ustanovljeno je da tijekom transkripcije nastaje primarni transkript RNA koji se ne translacija, već prolazi posttranskripcijsku doradu pri čemu se veliki



Slika 4. Tipovi sekvenci u ljudskom genomu

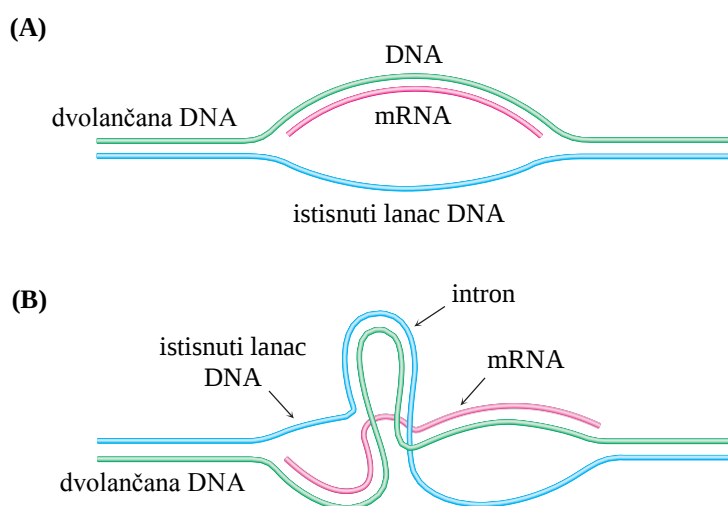
Genom je podijeljen u tri skupine: transpozoni, geni i ostalo. 27,4% genoma čine sekvence koje se prepisuju u RNA, i to 1,5% genoma čine kodirajuće sekvence, a čak približno 26% čine introni. U duge repetitivne sekvence spadaju telomere i centromere i one čine približno 8% genoma. SD (engl. *segment duplications*) i SSR (engl. *simple-sequence repeats*) čine približno 8% genoma. Oko 12% genoma čine ostale jedinstvene sekvence. Transpozoni čine oko 45% ljudskog genoma. Prilagođeno prema Nelson i Cox, 2008; Nelson i Cox, 2012.

dio primarnog transkripta izrezuje. Ti slijedovi koji se izrezuju iz primarnog transkripta i nemaju odgovarajući slijed u aminokiselinskoj sekvenci proteina za kojeg kodira mRNA, nazvani su introni, od pojma intervencijska sekvenca. Sukladno tome, dijelovi koji ostaju u zreloj mRNA nazivaju se eksoni, od pojma eksprimirana (očitovana) sekvenca (Berg i dr., 2013).

Izrezivanje introna i povezivanje eksona primarnog RNA transkripta zajedničko je svim eukariotskim, a i dijelu prokariotskih organizama, a događa se u jezgri eukariotske stanice tijekom transkripcije. U viših eukariota, tipičan gen ima dulje intronske sekvence nego eksonske (Nelson i Cox, 2008), primjerice gen koji kodira za β -podjedinicu hemoglobina sadrži dva introna s ukupno 892 nukleotida, dok na tri eksona ukupno otpada samo 438 nukleotida (Nelson i Cox, 2008). S druge strane, geni koji kodiraju za histone uopće nemaju introne (Nelson i Cox, 2008). Prosječni ljudski gen ima 8 introna čija veličina varira od 50 do čak 10 000 nukleotida (Berg i dr., 2013). Ukupno svega 1,5 % ljudske DNA je kodirajuća DNA, odnosno eksonska DNA koja sadrži informaciju za protein ili zreli RNA produkt (Slika 4.) (Nelson i Cox, 2008).

3.1. Otkriće introna

Elektromikroskopskim studijama hibrida nastalih između mRNA i segmenata DNA, koji su nosili odgovarajući gen, otkrivena je mozaična struktura eukariotskih gena (Slika 5.).

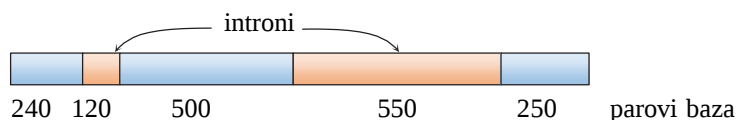


Slika 5. Detekcija introna elektronskom mikroskopijom

(A) Ako je gen kontinuiran, vidi se samo jedna omča dvolančane DNA (plavo).

(B) Ako gen sadržava introne, vide se dvije omče jednolančane DNA (plavo) i omča dvolančane DNA (plavo i zeleno). Crvenom bojom je prikazana mRNA (Berg i dr., 2013).

Ustanovljeno je da je kodirajuća sekvenca gena za β -lanac hemoglobina prekinuta jednim dugim intronom od 550 parova baza i jednim kratkim od 120 parova baza (Slika 6.), pa je na taj način β -globinski gen razdijeljen u tri kodirajuće sekvence (Berg i dr., 2013).



Slika 6. *Mozaična struktura eukariotskog gena za β -hemoglobin*

Gen za β -hemoglobin sastoji se od tri eksona (plavo) prekinuta s dva introna (narančasto).
Prilagođeno prema Berg i dr., 2013.

Novosintetizirani lanci RNA (pred-mRNA ili primarni transkript) izolirani iz stanične jezgre mnogo su dulji od mRNA; glede β -globinske RNA, u eksperimentu zonskog centrifugiranja primarni transkript sedimentira uz koeficijent 15S, a mRNA uz 9S. Uočeno je da primarni transkript β -globinskog gena sadrži dva područja koja nisu prisutna u mRNA, te se ta područja iz prvotnog 15S-transkripta izrezuju, a kodirajuće sekvence istodobno se povezuju pomoću preciznog enzima, čime nastaje zrela 9S-mRNA (Berg i dr., 2013). Zajedničko svojstvo u ekspresiji svih razlomljenih gena jest da eksoni u mRNA zadržavaju isti linearni raspored kakav su imali u DNA i primarnom transkriptu. Stoga slijed nukleotida unutar razlomljenih gena, kao i unutar cjelovitih gena, odgovara slijedu aminokiselina polipeptidnog lanca za kojeg kodiraju (Berg i dr., 2013).

3.2. Mehanizmi izrezivanja introna

Gotovo svi prvotni produkti transkripcije u eukariota se dorađuju i prekrajaju. Veličina nekih mRNA iznosi samo desetinu veličine njihovih preteča, koje mogu biti duge 30 kilobaza i više (Berg i dr., 2013). Gotovo svi geni kod viših eukariota sastoje se od introna i eksona, gdje se introni moraju izrezati, a eksoni pravilno povezati kako bi nastala zrela mRNA procesom koji se naziva prekrajanje (engl. *splicing*). Prekrajanje je vrlo specifično, a uključuje mjesta prekrajanja na 5'-strani i 3'-strani introna, kao i mjesto grananja. Mutacije u bilo kojem od ova tri mjesta dovode do pogrešnog prekrajanja. Prekrajanje se događa dvjema transesterifikacijskim reakcijama pri čemu broj fosfodieterskih veza ostaje nepromijenjen, stoga za odvijanje transesterifikacijskih reakcija ne trebaju izvori energije poput molekula ATP ili GTP. Po završetku prekrajanja spajaju se dva eksona, a intron se oslobađa u obliku omče (Berg i dr., 2013). Izrezivanje introna i ligacija eksona događaju se istovremeno te je to jedan

od fundamentalnih načina genske regulacije, kao i izvor proteinske raznolikosti u viših eukariota (Ritchie i dr., 2009).

3.2.1. Izrezivanje spliceosomskih introna

Najveću grupu introna, nazvanih *spliceosomski* introni, nalazimo u jezgrinom genomu svih eukariota i veličinom variraju od samo desetak baza kod nekih protista pa do stotine kilobaza kod sisavaca (Roy i Gilbert, 2006). Nazivaju se *spliceosomski* introni jer njihovo izrezivanje katalizira veliki ribonukleoproteinski kompleks koji se naziva *spliceosom* (kompleks za prekrajanje) (Nelson i Cox, 2008). *Spliceosomske* introne ne nalazimo kod prokariota, a njihov broj jako varira između eukariotskih vrsta, pa tako neke vrste imaju manje od 100 introna po genomu, dok taj broj kod biljaka i kralješnjaka premašuje tisuću po genomu (Roy i Gilbert, 2006).

Kompleks za prekrajanje građen je od specifičnih RNA-protein kompleksa koji se nazivaju snRNP-ovi (Nelson i Cox, 2008; Rino i Carmo-Fonseca, 2009; Berg i dr., 2013). Svaki snRNP, uz protein, sadrži jednu molekulu snRNA koje u pravilu imaju od 100 do 200 nukleotida (Nelson i Cox, 2008; Berg i dr., 2013). Potrebno je pet snRNP-ova za izrezivanje introna i ligaciju eksona, a to su U1, U2, U4, U5 i U6 snRNP-ovi (Rino i Carmo-Fonseca, 2009). Tih pet snRNP-ova, zajedno s preko 100 drugih proteina nazvanih faktorima prekrajanja (Roy i Gilbert, 2006; Berg i dr., 2013), tvore veliki, dinamički ribonukleoproteinski kompleks koji se zove kompleks za prekrajanje (*spliceosom*) (Rino i Carmo-Fonseca, 2009). Proteini u snRNP-ovima i molekule snRNA su jako očuvane u eukariotskih organizama, od kvasaca pa do ljudi (Nelson i Cox, 2008). Sklapanje kompleksa za prekrajanje iz njegovih sastavnih dijelova je proces ovisan o ATP-u koji se odvija prema predlošku supstrata pred-mRNA, a usmjeren je očuvanom sekvencom introna u mjestu prekrajanja (Ritchie i dr., 2009).

Samoorganizacija je generalni mehanizam na koji se makromolekularne strukture formiraju i održavaju u jezgri (Misteli, 2001, 2005). Samoorganizacija podrazumijeva spontani nastanak strukture pomoću interakcija njezinih sastavnih dijelova. Nadalje, samoorganizacija podrazumijeva fizičku interakciju između dijelova koji se ne slažu u termodinamički stabilnu strukturu, već su interakcije upravljane dinamikom ustaljenog stanja (engl. *steady-state dynamics*). Sukladno tome, ovakav način slaganja je u potpunosti reverzibilan. Proteini kompleksa za prekrajanje su u stanju vječnog toka, odnosno kreću se unutar jezgre slobodnom difuzijom neovisno o inicijalnoj lokaciji i prolaznim interakcijama s pred-mRNA (Kruhlak i

dr., 2000; Phair i Misteli, 2000; Klingauf i dr., 2006; Rino i dr., 2007). Na temelju ovih podataka predloženo je da je sklapanje kompleksa za prekrajanje iz njegovih sastavnih dijelova spontan i samoorganiziran proces (Rino i Carmo-Fonseca, 2009).

Za svaki intron, kompleks za prekrajanje se sastavlja *de novo* iz njegovih sastavnih dijelova (Galej i dr., 2014). Međutim, sastavni dijelovi kompleksa za prekrajanje nisu homogeno distribuirani u staničnoj jezgri sisavaca (Rino i Carmo-Fonseca, 2009). Mikroskopski testovi pokazuju da se velika većina poznatih komponenti nalazi u karakterističnom šarenom uzorku unutar jezgre, dok su *spliceosomski* snRNP-ovi koncentrirani oko Cajalovog tijela (Cioce i Lamond, 2005; Stanek i Neugebauer, 2006).

U uvjetima *in vitro*, transkript nastao djelovanjem RNA-polimeraze II biva izrezan u roku 15-60 minuta (Das i dr., 2006), dok je prosječno vrijeme izrezivanja introna u uvjetima *in vivo* manje od 3 minute (Beyer i Osheim, 1988; Wetterberg i dr., 2001). To znači da je izrezivanje introna puno dinamičniji proces unutar žive stanice nego u staničnom ekstraktu. Prekrojanje jezgrinih pred-mRNA zahtjeva dvije, relativno jednostavne, S_N2 transesterifikacijske reakcije koje uključuju funkcionalne grupe tri reaktivne regije pred-mRNA (Wahl i dr., 2009).

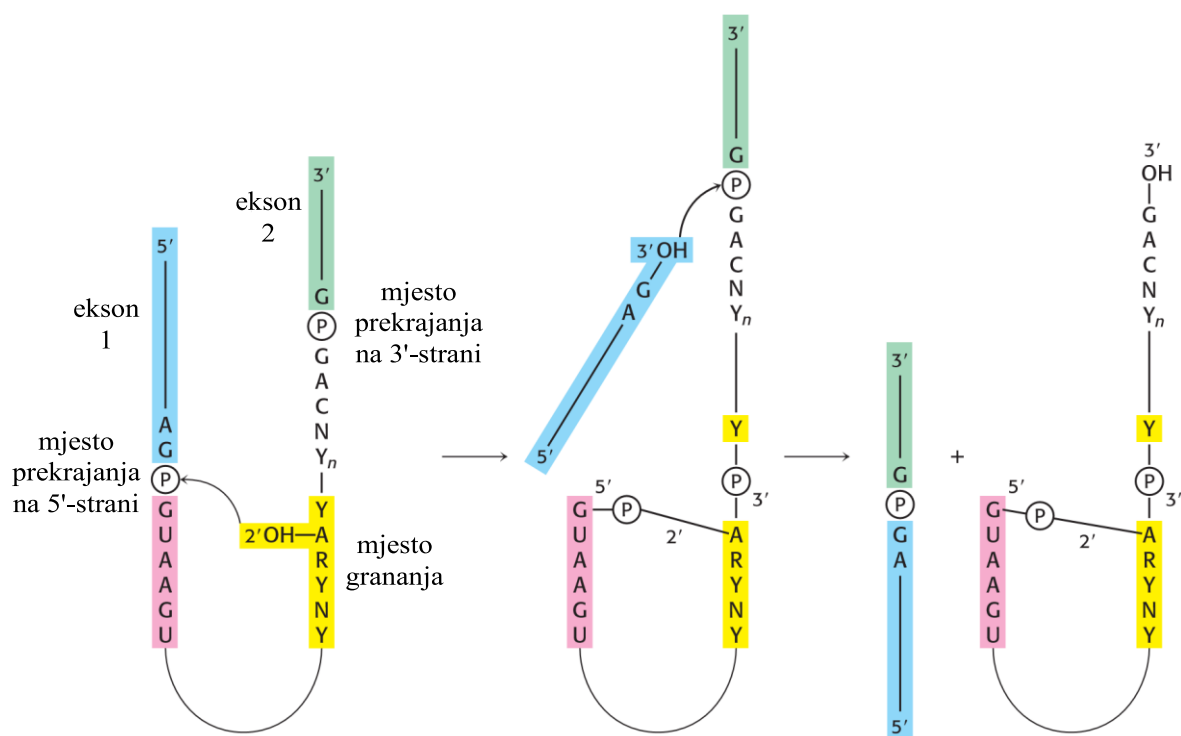
Eukariotski intron na 5'-strani počinje s GUAAGU, gdje je GU nepromjenjiv, dok na 3'-strani introna je slijed od 10 pirimidina (polipirimidinski slijed), iza čega se nalazi bilo koja baza N, zatim C i sačuvani AG slijed. Mjesto grananja je važan unutarnji slijed između 20. i 50. nukleotida uzvodno od mjesta prekrojanja na 3'-strani. U sisavaca su pronađene različite sekvencu na tom mjestu, dok kod kvasaca mjesto grananja gotovo uvijek ima slijed UACUAAC. Adenilatni nukleotid je tu izuzetno bitan jer upravo on nukleofilno napada mjesto prekrojanja na 5'-strani (Slika 7.) (Berg i dr., 2013).



Slika 7. Mjesto prekrojanja kod eukariota

Intron u pravilu počinje s GU, a završava sa slijedom AG. Mjesto grananja sadrži sačuvani adenilatni ostatak (A) važan za prekrojanje, nakon kojeg ide polipirimidinski slijed, pa bilo koja baza, zatim C i sačuvani slijed AG. Prilagođeno prema Berg i dr., 2013.

Prva transesterifikacijska reakcija počinje nukleofilnim napadom 2'-OH skupine adenilatnog ostatka u mjestu grananja na uzvodni ekson (ekson 1) pri čemu dolazi do stvaranja 2'-5'-fosfodieterske veze između A ostatka i fosfata na 5'-kraju introna. Kako je adenilatni ostatak povezan s dva druga nukleotida normalnim 3'-5'-fosfodieterskim vezama, na tom mjestu se stvara ogranak i nastaje međuprodukt u obliku omče. Druga transesterifikacijska reakcija je nukleofilni napad 3'-OH skupine na kraju eksona 1 na fosfodietersku vezu između introna i eksona 2. Dolazi do spajanja eksona 1 i 2, dok se intron oslobađa u obliku omče (Slika 8.) (Berg i dr., 2013).



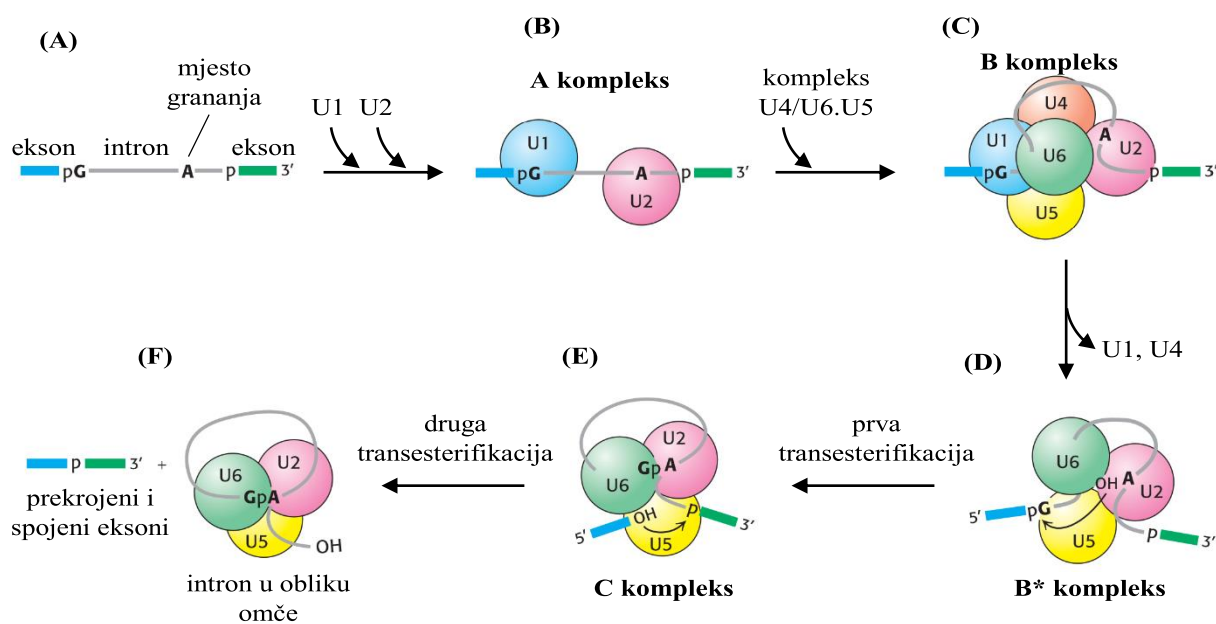
Slika 8. Mehanizam prekrajavanja preteča mRNA

Uzvodni ekson (5') prikazan je plavo, nizvodni (3') zeleno, a mjesto grananja žuto. Prekrajavanje počinje nukleofilnim napadom 2'-OH skupine sačuvanog adenilatnog ostatka u mjestu grananja na uzvodni ekson, a završava nukleofilnim napadom 3'-OH skupine uzvodnog eksona na fosfodietersku vezu između introna i nizvodnog eksona, pri čemu se dva eksona spajaju, a intron otpušta u obliku omče. Prilagođeno prema Berg i dr., 2013.

Prekrajavanje počinje ATP-neovisnim procesom prepoznavanja mjesta prekrajavanja na 5'-strani introna (5'-SS, engl. *splice site*) (Galej i dr., 2014) i 5'-kraju snRNP-a U1 (Slika 9.A) (Berg i dr., 2013). U viših eukariota, ove interakcije su stabilizirane proteinima bogatim serinskim i argininskim aminokiselinama (SR) i proteinima U1 snRNP-a (Wahl i dr., 2009). Većina funkcionalno važnih RNA-RNA interakcija unutar kompleksa za prekrajavanje su slabe interakcije, i potrebni su proteini da bi povećali njihovu stabilnost (Wahl i dr., 2009). Dolazi do

interakcija između proteina SF1/BBP s mjestom grananja (BPS, engl. *branch point site*) i heterodimera U2AF (U2 pomoćni faktor, engl. *U2 auxiliary factor*) s polipirimidinskom sekvencom nizvodno od BPS-a (Wahl i dr., 2009). Ovi proteini se vežu kooperativno, i u konačnici stvaraju E kompleks (Wahl i dr., 2009). U2 snRNP se potom, u ATP-ovisnom procesu (Wahl i dr., 2009), stabilno veže na mjesto prekrajanja i nastaje pre-spliceosomski A kompleks (Slika 9.B) (Rino i Carmo-Fonseca, 2009).

Kompleks U4/U6.U5 dolazi u interakciju s kompleksom A kao već prethodno samostalno sklopljen kompleks, čime nastaje B kompleks (Slika 9.C) (Rino i Carmo-Fonseca, 2009; Wahl i dr., 2009). Iako su u tom trenutku svi snRNP-ovi prisutni, B kompleks je i dalje katalitički inaktivan. Velikom konformacijskom i kompozicijskom promjenom B kompleksa dolazi do disocijacije U1 i U4 snRNP-a čime nastaje aktivni kompleks za prekrajanje, odnosno kompleks B* (Slika 9.D) (Wahl i dr., 2009).

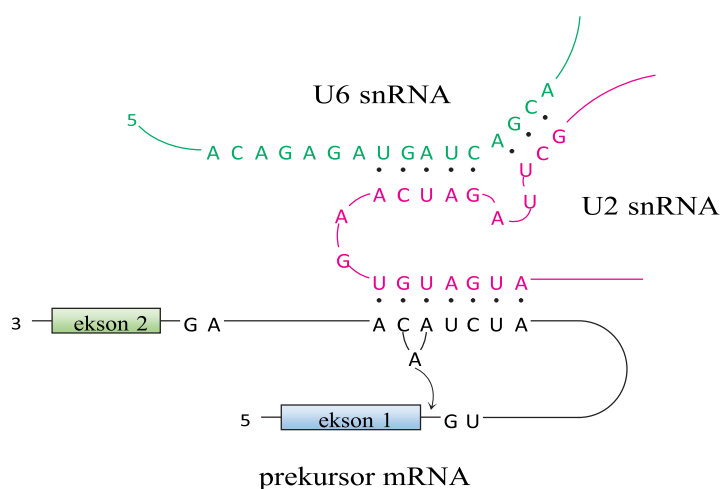


Slika 9. Slaganje kompleksa za prekrajanje.

- (A) Molekula RNA s dva eksona i jednim intronom. A označuje očuvani adenzin unutar introna.
- (B) Vezanjem U1 na mjesto prekrajanja na 5'-strani introna i U2 na mjesto grananja nastaje A kompleks.
- (C) Ranije sklopljeni kompleks U4/U6.U5 veže se na A kompleks pa nastaje B kompleks.
- (D) Disocijacijom U1 i U4 s kompleksa B nastaje funkcionalni *spliceosomski* kompleks B*. Dolazi do prve transesterifikacijske reakcije gdje adenzin iz mjesta grananja napada mjesto prekrajanja na 5'-strani introna čime nastaje C kompleks.
- (E) C kompleks katalizira drugu transesterifikacijsku reakciju u kojoj hidroksilna skupina u mjestu prekrajanja na 5'-strani introna napada mjesto prekrajanja na 3'-strani.
- (F) Rezultat dviju transesterifikacijskih reakcija je prekrajeni i spojeni ekson i nastanak omče od introna vezanog za U2, U5 i U6. Prilagođeno prema Berg i dr., 2013.

U5 stvara interakcije sa sljedovima na 5'-strani introna te potom i s eksonom na 3'-strani. Odvajanjem U6 od U4 dolazi do intramolekulskog preslagivanja koje dopušta sparivanje U6 s bazama u U2 i interakciju s 5'-krajem introna. Dolazi do nastanka uzvojnice U2-U6 koja je krucijalna za prekrajanje jer djeluje kao katalitičko središte kompleksa za prekrajanje (Slika 10.) (Berg i dr., 2013). Navedeno preslagivanje rezultira prvom transesterifikacijskom reakcijom koja uključuje nukleofilni napad 2'-hidroksilne skupine očuvanog adenzina unutar introna na 5'-kraju introna pri čemu nastaje slobodni 5'-ekson i ciklički intermedijer sa 2'-5'-fosfodieterskom vezom (Ritchie i dr., 2009). Prvom transesterifikacijskom reakcijom B* kompleks se pretvara u C kompleks (Slika 9.E) (Rino i Carmo-Fonseca, 2009).

Dodatnim preuređivanjem C kompleksa U5 pronalazi slobodni 5'-ekson i poravnava ga



Slika 10. *Prekrajčko katalitičko središte*

Katalitičko središte kompleksa za prekrajanje nastalo sparivanjem baza između snRNA U2 (crveno) i snRNA U6 (zeleno) te U2 s bazama u mjestu grananja u preteči mRNA. Prilagođeno prema Berg i dr., 2013.

s 3'-eksonom čime se olakšava druga transesterifikacijska reakcija. 3'-hidroksilna skupina 5'-eksona nukleofilno napada mjesto za prekrajanje s 3'-strane introna čime nastaje prekrojeni produkt (Ritchie i dr., 2009, Berg i dr., 2013). U2, U5 i U6, vezani za izrezani intron u obliku omče, otpuštaju se i time reakcija prekrajanja završava (Slika 9.F) (Berg i dr., 2013).

3.2.2. Samoizrezivanje introna grupe II

Introne grupe II prvenstveno nalazimo u primarnim transkriptima mitohondrijskih i kloroplastnih mRNA u gljiva, algi i biljaka, a rijetko ih se može pronaći i kod bakterija (Nelson i Cox, 2008). To je jako mala grupa samoizrezujućih introna i do sada je identificirano oko 200 introna grupe II (Cannone i dr., 2002). Sama kemija izrezivanja introna grupe II ista je kao kod *spliceosomskih* introna (vidi odjeljak 3.2.1.), samo što se izrezivanje vrši bez proteinskih faktora.

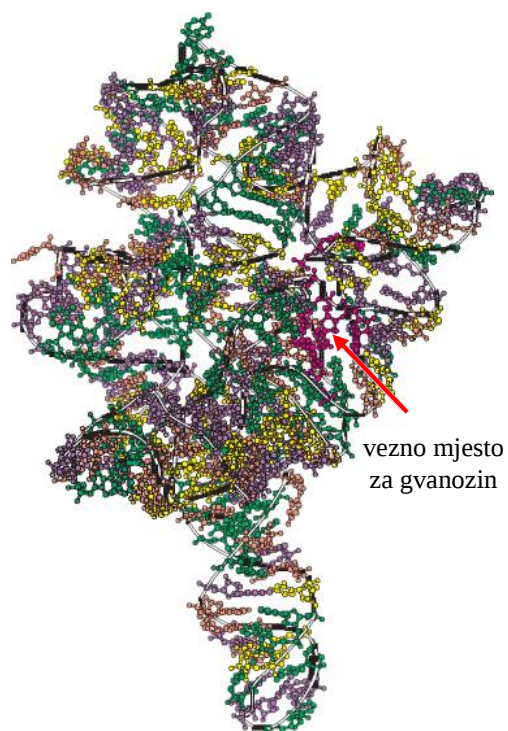
3.2.3. Samoizrezivanje introna grupe I

Introni grupe I pronađeni su u nekim jezgrenim, mitohondrijskim i kloroplastnim genima koji kodiraju za molekule rRNA, mRNA i tRNA, a mogu se pojaviti i u nekih bakterija (Nelson i Cox, 2008). Do sada je poznato oko 1500 introna grupe I (Cannone i dr., 2002). Introni grupe I, kao i introni grupe II, za izrezivanje ne zahtijevaju visokoenergetske kofaktore, kao npr. ATP, već se radi o samoizrezujućim intronima (Nelson i Cox, 2008) koji sadrže posebnu strukturu RNA koja olakšava njihovo samoizrezivanje (Roy i Gilbert, 2006).

Jedan od najboljih primjera izrezivanja introna iz pred-rRNA proučavan je na jednostaničnoj eukariotskoj praživotinji *Tetrahymena* gdje je uočen 414-nukleotidni intron u preteči 26S rRNA. Detaljnim pokusima ustanovljeno je da pred-rRNA bez prisustva proteina prekraja samu sebe te da RNA zapravo nosi katalitičku aktivnost, odnosno da se ponaša kao ribozim (Berg i dr., 2013).

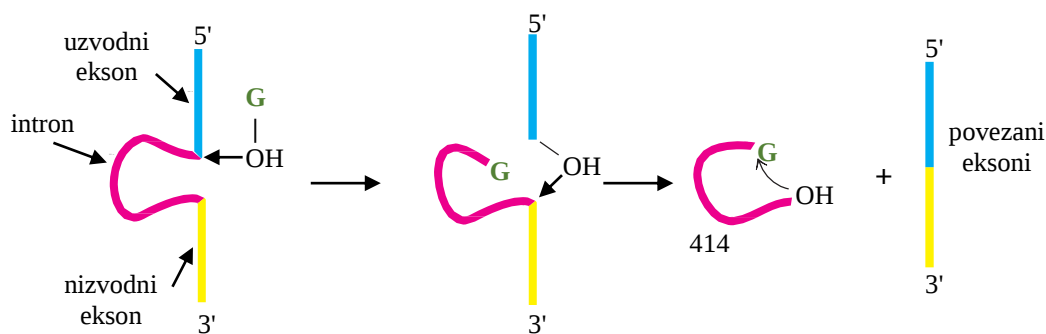
Samoprekrajanje kod introna grupe I ovisi o strukturnoj očuvanosti preteče RNA zato što je velik dio introna potreban za prekrajanje. Naime, preteča RNA ima jasno definiranu sekundarnu strukturu stabiliziranu mnoštvom dvolančanih petlji i brojnim omčama i kao takva tvori dobro definirano mjesto za vezanje gvanozina (Slika 11.) (Berg i dr., 2013, Roy i Gilbert, 2006). Za samoprekrajanje introna grupe I nužan je kofaktor gvanozinska jedinica, gdje gvanozin, bio on u obliku GMP, GDP ili GTP, ne služi kao izvor energije nego kao napadajuća skupina koja se privremeno uključuje u molekulu RNA (Berg i dr., 2013).

Kod ovih introna uočeno je da se mjesta prekrajnja mogu pozicionirati u odnosu na katalitičke ostatke interakcijama komplementarnih sljedova u intronu, u 5'-eksonu i u 3'-eksonu koje se zovu interne vodeće sekvence (IGS, engl. *internal guide sequence*). IGS približi gvanozinski kofaktor i mjesto prekrajnja na 5'-strani introna, tako da 3'-OH skupina gvanozina može nukleofilno napasti fosforov atom na tom mjestu prekrajnja. Nukleofilni napad 3'-OH skupine gvanozina je prvi korak samoprekrajnja. 3'-OH skupina gvanozina tvori normalnu 3'-5'-fosfodiestersku vezu s 5'-krajem introna. 3'-OH skupina eksona koji se odvojio potom nukleofilno napada 3'-kraj introna u drugoj transesterifikacijskoj reakciji. Između dva eksona stvara se nova fosfodiesterska veza, a intron se zajedno s gvanozinskim kofaktorom otpušta kao linearna molekula (Slika 12.) (Berg i dr., 2013).



Slika 11. *Struktura samoprekrajajućeg introna*

Prikazana je struktura velikog fragmenta samoprekrajajućeg introna iz *Tetrahymena*. Zelena boja označuje bazu A, žuta C, ljubičasta G, a narančasta U. Strelica označuje vezno mjesto za gvanozin (Berg i dr., 2013).

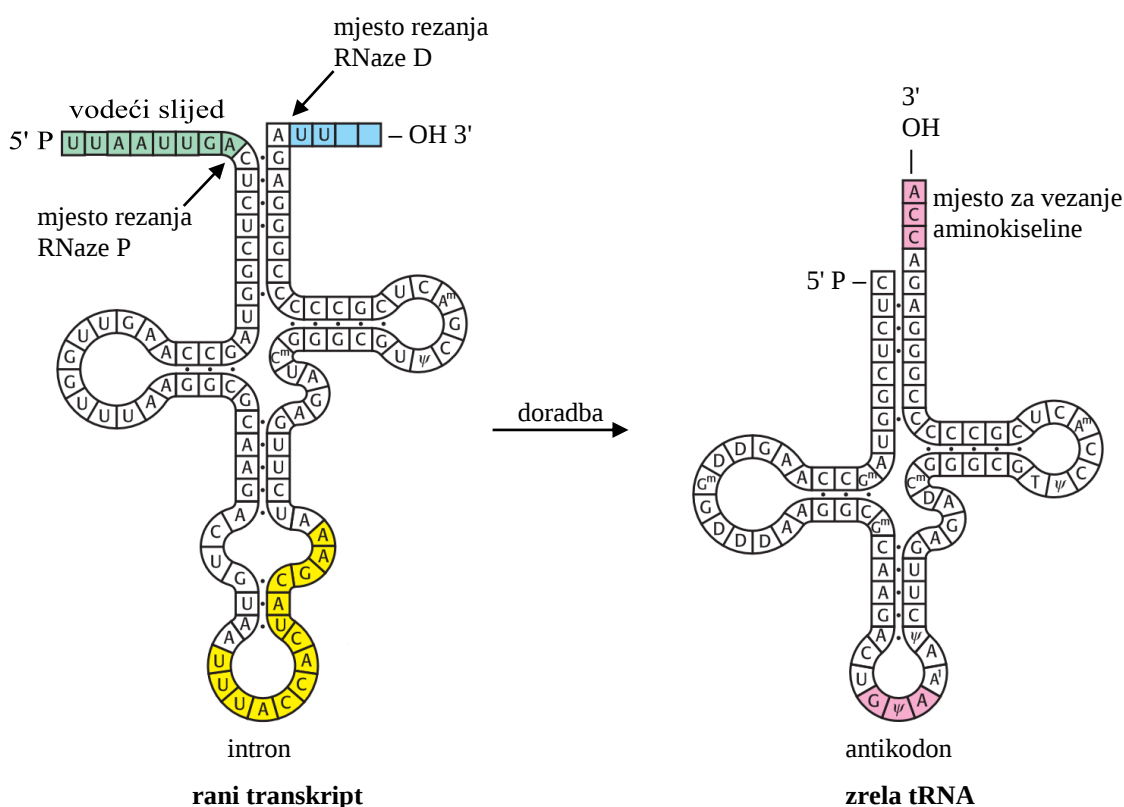


Slika 12. *Samoprekrajanje introna grupe I*

Samoprekrajanje preteče ribosomske RNA u *Tetrahymena* uključuje gvanozinski kofaktor (G) prikazan zeleno, 414-nukleotidni intron prikazan crveno i dva eksona prikazana plavo i žuto (Berg i dr., 2013).

3.2.4. Izrezivanje introna iz pred-tRNA

Posttranskripcijsko procesiranje i izrezivanje introna iz primarnih transkripata nije ograničeno samo na pred-mRNA (Nelson i Cox, 2008), već se i eukariotske pred-tRNA prekrajaju endonukleazama i ligazom kako bi se uklonio intron (Berg i dr., 2013). Eukariotski genom sadrži nekoliko stotina pa do nekoliko tisuća tRNA gena (Voet i Voet, 2010). Molekule tRNA derivati su dugog prekursora nastali enzimskim cijepanjima i na 5'-kraju i na 3'-kraju. Endonukleaza RNaza P, pronađena u svim živim organizmima, izrezuje RNA na 5'-kraju tRNA, dok 3'-kraj procesira egzonukleaza RNaza D (Nelson i Cox, 2008). 3'-terminalni trinukleotidni slijed CCA, na koji se veže pripadajuća aminokiselina specifična za pojedinu tRNA, nije kodiran genomom već nastaje tijekom procesiranja djelovanjem enzima CCA-dodajuća polimeraza koji kao supstrat koristi CTP i ATP (Voet i Voet, 2010; Berg i dr., 2013) (Slika 13.). Naposljetku, djelovanjem specifičnih endonukleaza i ligaza izrezuje se intron i povezuju se dva eksona molekule tRNA (Berg i dr., 2013).



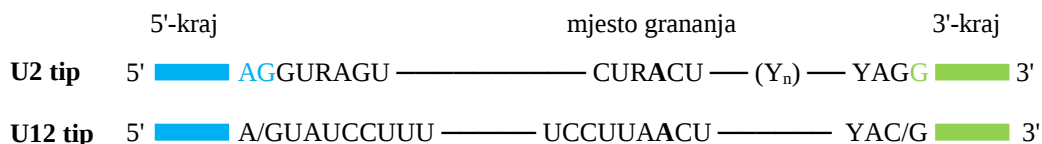
Slika 13. Procesiranje preteče tRNA u eukariota

Za prikaz najbitnijih koraka korištena je kvašćeva tRNA^{Tyr}. Vodeći slijed na 5'-kraju reže RNaza P (zeleno), dok 3'-kraj procesira RNaza D (plavo). Posebne endonukleaze izrezuju 14-nukleotidni intron (žuto) i CCA enzim dodaje trinukleotidni slijed CCA na 3'-kraj (crveno). Uz to, dolazi i do modifikacije nekoliko baza. Prilagođeno prema Nelson i Cox, 2008; Berg i dr., 2013.

Mehanizam izrezivanja introna iz pred-tRNA razlikuje se od mehanizma koji koriste samoprekrajajući i *spliceosomski* introni u tri glavna koraka. Katalitičku aktivnost prekrajanja nosi proteinska molekula, a ne RNA kao što je slučaj kod samoprekrajajućih i *spliceosomskih* introna. Nadalje, endonukleaza simultano uvodi ureze na oba kraja introna te se on izrezuje u jednom koraku kao linearna molekula čime nastaje 2',3'-ciklički fosfodiester na 3'-kraju 5' eksona. I treće, za spajanje eksona potrebna je hidroliza dva nukleozid-trifosfata: GTP koji će donirati fosfatnu grupu za stvaranje 3'-5' veze i ATP koji donira AMP. U posljednjem koraku se uklanja 2'-fosfat s 5'-kraja eksona. Određene mutacije u pred-tRNA koje mijenjaju njezinu sekundarnu strukturu utječu na prekrajanje ukazujući da pred-tRNA mora biti složena u pravilnu sekundarnu strukturu da bi se intron ispravno izrezao, a kako se intron uvijek nalazi u blizini antikodonske petlje, pred-tRNA se prije prekrajanja složi najvjerojatnije slično kao i zrela tRNA (Lodish i dr., 2013).

3.2.5. AT-AC introni

Većina introna na 5'-strani počinje s GT sekvencom, a završava s AG sekvencom na 3'-strani (Hastings i dr., 2005). Jednostavni eukarioti, kao što su kvasci, imaju samo jedan set snRNP-ova koji izrezuju upravo gore navedene introne (Alberts i dr., 2007). Međutim, kompleksniji eukarioti, kao što su *Drosophila*, sisavci i biljke, imaju još jedan set snRNP-ova koji izrezuju malu grupu introna (Alberts i dr., 2007), otkrivenu tek nedavno, koja na 5'-kraju ima AT umjesto GT slijeda, dok na 3'-kraju ima AC umjesto AG slijeda (Voet i Voet, 2010). Introni ove grupe nazvani su AT-AC, introni (ili AU-AC introni prema sekvenci RNA) i izrezuju se pomoću U12 kompleksa za prekrajanje (Hastings i dr., 2005) zato što koriste U12 snRNP (Alberts i dr., 2007). Međutim, daljnjim studijama ustanovljeno je da neki U2-ovisni introni također sadrže AT-AC slijed. Uz to, pronađeni su mnogi U12-ovisni introni koji sadrže GT, odnosno AG na 5' odnosno 3'-strani (Dietrich i dr., 1997).

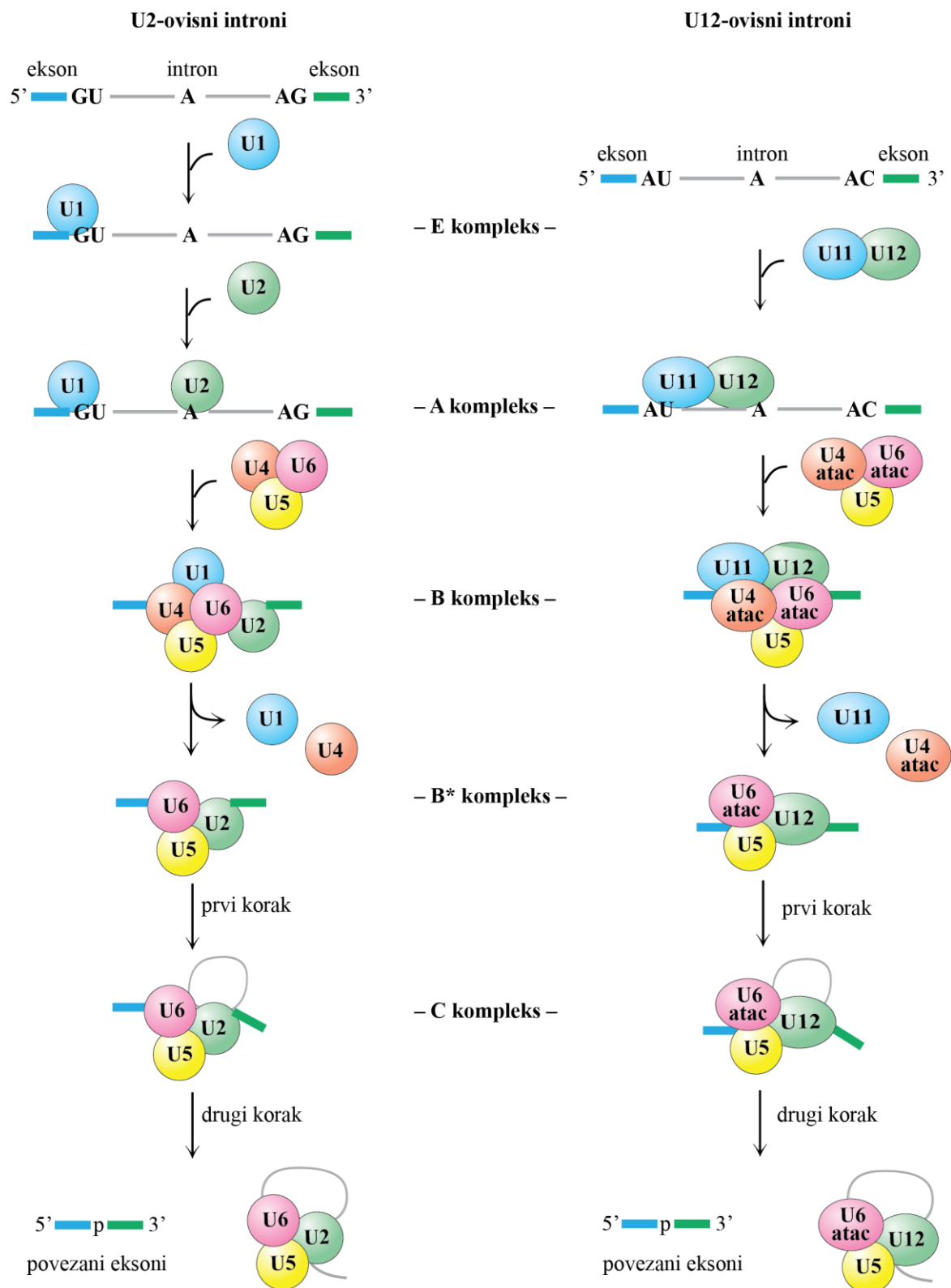


Slika 14. U2 i U12 tip introna s prikazanim mjestom grananja

Konzervirana sekvenca U2-ovisnog introna sisavaca i U12-tip introna raznih organizama. Prilagođeno prema Will i Lührmann, 2005.

Ono što određuje hoće li će intron biti izrezan pomoću U2 ili U12 kompleksa za prekrajanje je 5'-strana i mjesto grananja (Will i Lührmann, 2005). U12-ovisni introni na 5'-strani sadrže A/GUAUCCUUU sekvencu, a sekvenca mjesta grananje je UCCUUAACU. Kao što je vidljivo na slici 14., mjesto grananja U12-ovisnih introna je duže i usko ograničeno za razliku od U2-ovisnih (Will i Lührmann, 2005). Ne postoji specifično obilježena sekvenca na 3'-strani potrebna za U12 kompleks za prekrajanje, već se tu mogu nalaziti različiti dinukleotidi (Dietrich i dr., 2001; Levine i Durbin, 2001; Hastings i dr., 2005), ali tipično su to YAC ili YAG sekvence (Will i Lührmann, 2005). Nadalje, prosječna udaljenost između mjesta grananja i 3'-kraja je manja i vrlo ograničena, te otprilike sadrži 18-40 nukleotida (Hall i Padgett, 1994; Dietrich i dr., 2001; Levine i Durbin, 2001). U12-ovisni introni izrezuju se na isti način kao i U2-ovisni introni (Moore i dr., 1993; Patel i Steitz, 2003).

U12-ovisni kompleksi za prekrajanje građeni su od U11, U12, U5 i U4atac/U6atac snRNP-ova („atac“ označuje da navedeni kompleks pripada U12-ovisnom kompleksu za prekrajanje koji izrezuje introne koji počinju sa slijedom AT, a završavaju sa slijedom AC), te nepoznatog broja ne-snRNP proteina (Hall i Padgett, 1996; Tarn i Steitz, 1996a, 1996b). Prema ovome, jedino U5 snRNP je zajednički i U2 i U12 kompleksima za prekrajanje, dok su U11, U12 i U4atac/U6atac strukturni i funkcionalni analozi od U1, U2 i U4/U6 (Voet i Voet, 2010) (Slika 15.). Iako U12-ovisni introni predstavljaju manje od 1% svih introna prisutnih u ljudskim stanicama (Levine i Durbin, 2001), otkriveno je da sudjeluju u replikaciji i popravku DNA, transkripciji, procesiranju i translaciji RNA, te njihovo uklanjanje može dovesti do poteškoća u izrezivanju pre-mRNA koje sadrže bilo U2 bilo U12 introne (Patel i dr., 2002). Pojavljuju se u različitim organizmima, npr. *Drosophila*, biljke i ljudi (Voet i Voet, 2010), ali ih nema u kvascima i nematodima (Will i Lührmann, 2005). Također, nisu konzervirani ni u svojoj duljini ni u poziciji u genu, pa im je funkcionalno i evolucijsko značenje i dalje nepoznato (Voet i Voet, 2010).



Slika 15. Mehanizam nastajanja U2 i U12 kompleksa za prekrajanje

U12-ovisni kompleksi za prekrajanje građeni su od U11, U12 i U4atac/U6atac.U5 snRNP, dok su U2-ovisni kompleksi za prekrajanje građeni od U1, U2, U5 i U4/U6.U5 snRNP-ova. U oba kompleksa za prekrajanje zajednički snRNP je U5. Prilagođeno prema Will i Lührmann, 2005.

3.3. Alternativno prekrajanje molekula pred-mRNA

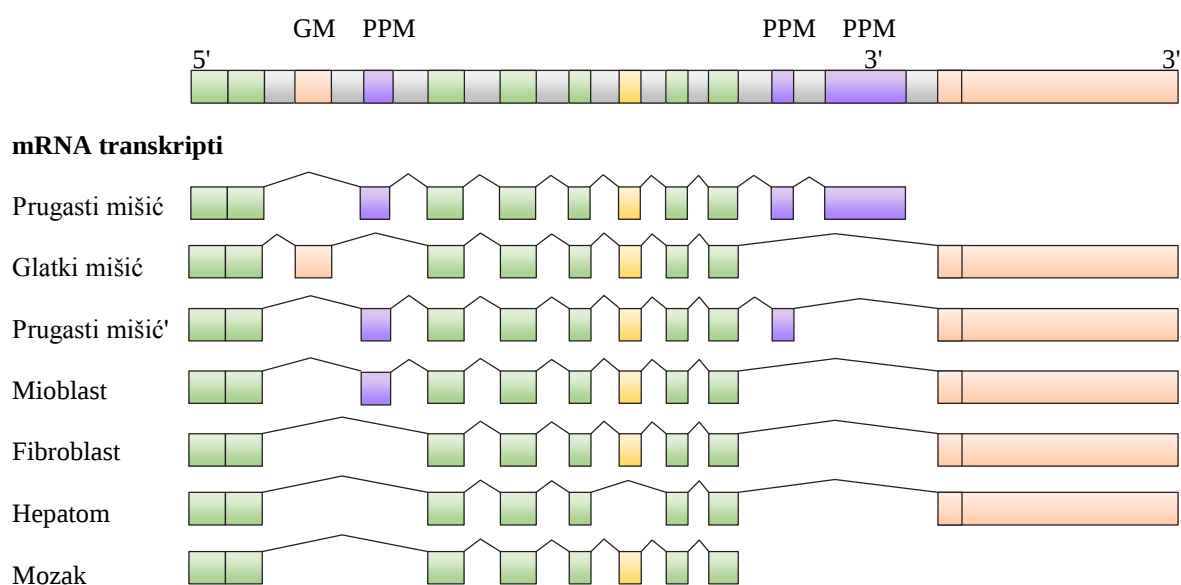
Otkriće da eukariotski geni sadrže introne te da se eksoni mogu povezati na više različitih načina potaknulo je pitanje o definiciji gena. Rani radovi pokazali su da većina gena odgovara regiji genoma koja usmjerava sintezu jednog enzima. Ovo je dovelo do hipoteze da jedan gen kodira za jedan polipeptidni lanac. Kasnije je gen definiran kao dio DNA koji se prepisuje u RNA i kodira za jedan polipeptidni lanac. Međutim, otkrićem alternativnog prekrajanja RNA postalo je jasno da mnoge sekvence DNA mogu proizvesti skup različitih, ali srodnih, proteina. Također je moguće da jedna transkripcijska jedinica producira dva bitno različita eukariotska proteina. U tom slučaju smatra se da su dva proteina nastala od različitih gena koji se preklapaju na kromosomu (vidi odjeljak 2.3.2). Zbog toga je definicija gena promijenjena i danas se za gen smatra bilo koji slijed unutar DNA koji se prepisuje kao jedna cjelina i kodira jedan skup usko povezanih polipeptidnih lanaca (proteinskih izoformi) (Alberts i dr., 2007).

Ekspresija brojnih staničnih gena regulirana je alternativnim načinom prekrajanja pred-mRNA, odnosno jedna te ista pred-mRNA molekula može se u različitim stanicama prekrojiti na različite načine i u konačnici dovesti do stvaranja različitih proteina. Alternativno prekrajanje događa se kod svih metazoa, a ponajviše kod kralješnjaka. Čak 95% strukturnih gena kod čovjeka ima barem jedan način alternativnog prekrajanja, dok u prosjeku svaki ljudski strukturni gen kodira tri različita proteina (Voet i Voet, 2010). Ovo otkriće išlo je u prilog teoriji da ljudski genom ima svega 23 000 gena, iako se prema prvim procjenama očekivalo 50 000 pa do čak 140 000 strukturnih gena (Voet i Voet, 2010).

Alternativno prekrajanje često je i u muha, gdje se prema nekim procjenama čak 40% gena alternativno prekraja. Nasuprot tome, alternativno prekrajanje rijetko nalazimo u nižih eukariota, kao što su kvasci. Kvasci imaju u prosjeku oko 6 200 gena, od kojih se samo 300 prekraja, nasuprot 14 000 gena u muha od kojih je oko 5 500 podložno alternativnom prekrajanju. Reći da muhe imaju samo 2-3 puta više gena od kvasaca uvelike podcjenjuje razliku u složenosti ovih dvaju organizama (Alberts i dr., 2007).

3.3.1. Alternativno prekrajanje α -tropomiozinske pred-mRNA

Načini na koje se pred-mRNA može prekrojiti su različiti, pa se tako ekson može zadržati ili izrezati iz pred-mRNA, intron se također može zadržati ili izrezati, a mogu se mijenjati i pozicije 5'-mjestu i 3'-mjestu prekrajanja čime nastaju duži, odnosno kraći eksoni. Očito je da broj gena unutar genoma ne osigurava adekvatnu procjenu proteinske raznolikosti organizma. Tako na primjer jedan gen iz štakora kodira sedam tkivno-ovisnih izoformi mišićnog proteina α -tropomiozina pomoću alternativnog prekrajanja (Slika 16.) (Voet i Voet, 2010).

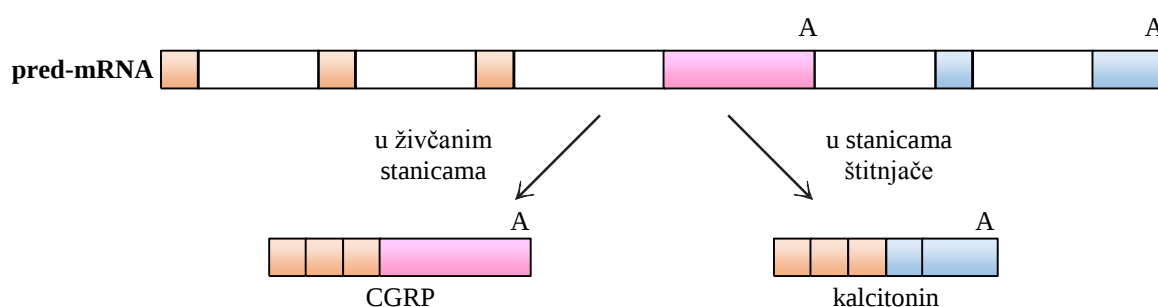


Slika 16. Organizacija α -tropomiozinskog gena iz štakora i alternativni način prekrajanja

Prikazano je sedam alternativnih putova izrezivanja α -tropomiozinskog gena iz štakora koji u konačnici produciraju stanično-specifične α -tropomiozinske izoforme. Tanke sive linije predstavljaju mjesto gdje se nalazio intron prije izrezivanja. Konstitutivni eksoni prikazani su zeleno i oni se ekspimiraju u svim tkivima. Narančasto je prikazan ekson ekspimiran samo u glatkom mišićnom tkivu (GM), eksoni ekspimirani u poprečno-prugastom mišićnom tkivu (PPM) su prikazani ljubičasto, dok su žuto prikazani varijabilno ekspimirani eksoni. Glatki i poprečno-prugasti mišićni eksoni se međusobno isključuju, te isto tako postoji alternativni 3' netranslatirani ekson kod poprečno-prugastog mišićnog tkiva. Prilagođeno prema Voet i Voet, 2010.

3.3.2. Alternativno prekrajanje kalcitonin/CGRP pred-mRNA

Jedan od dobrih primjera alternativnog prekrajanja pred-mRNA koja rezultira nastankom dvaju različitih proteina, svakog specifičnog za svoje tkivo, uočen je kod ekspresije gena koji kodira za kalcitonin i peptid povezan s kalcitoninskim genom (CGRP, engl. *calcitonin-gene related peptide*). Ukoliko se dotični gen eksprimira u stanicama štitnjače, prilikom alternativnog prekrajanja pred-mRNA izostaje izrezivanje introna 4 što vodi nastanku kalcitonina, peptidnog hormona koji regulira metabolizam kalcija i fosfora. Međutim, kod ekspresije istog gena u živčanim stanicama, intron 4 se prilikom prekrajanja pred-mRNA izrezuje, što vodi nastanku CGRP-a, peptidnog hormona s vazodilatacijskim djelovanjem (Slika 17.). Iz ovog jednostavnog primjera je vidljivo kako jedna te ista pred-mRNA može producirati dva posve različita peptidna hormona od kojih je svaki specifičan za svoje tkivo (Berg i dr., 2013).



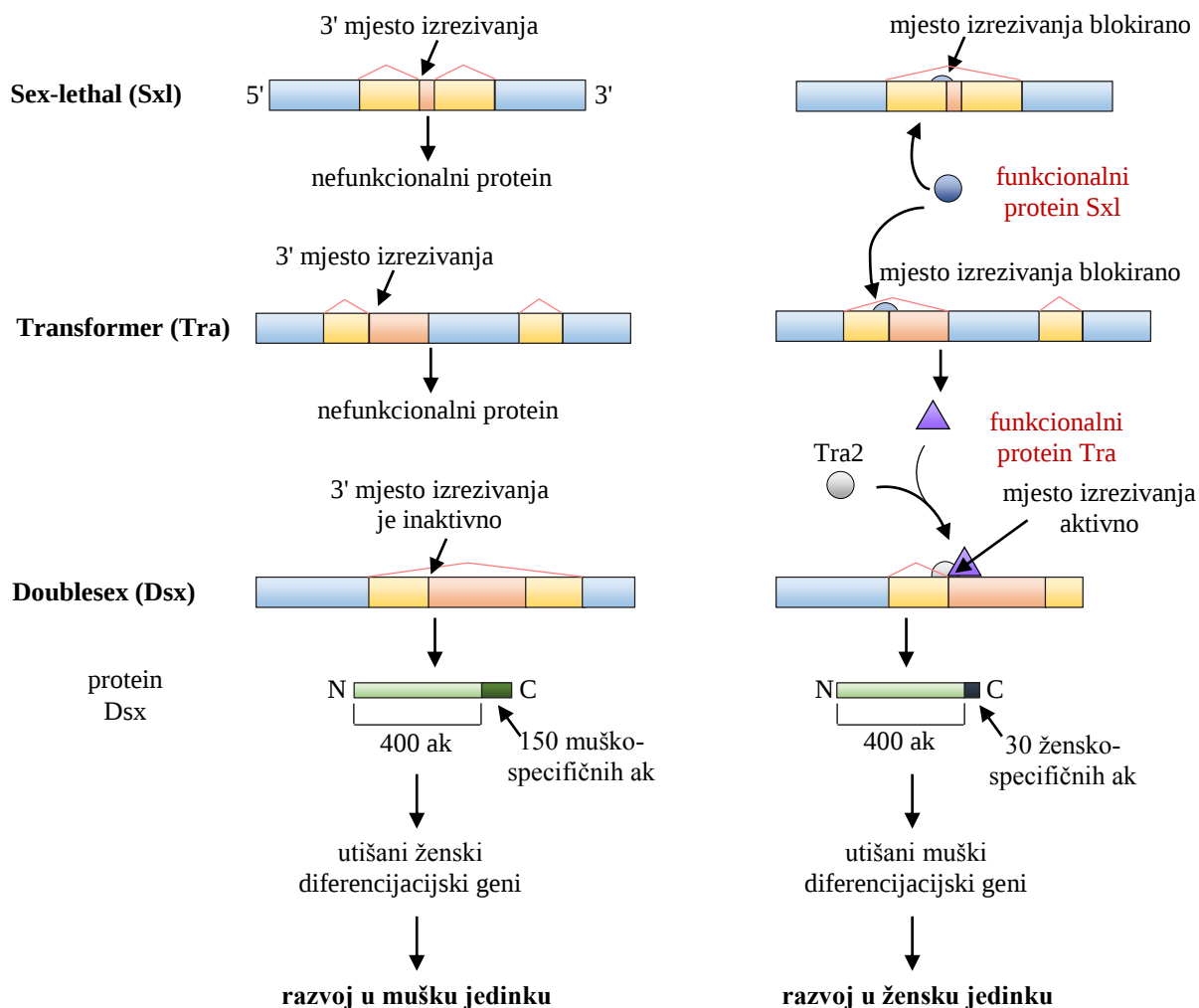
Slika 17. Alternativno prekrajanje kalcitonin/CGRP pred-mRNA

Iz jedne kalcitonin/CGRP pred-mRNA alternativnim prekrajanjem nastaje zrela mRNA za kalcitonin ili CGRP ovisno o tipu stanice u kojoj se događa prekrajanje. Svaki alternativni transkript uključuje jedan od dvaju alternativnih poliadenilacijskih signala (A) prisutnih u pred-mRNA. Prilagođeno prema Berg i dr., 2013.

3.3.3. Determinacija spola kod vinske mušice *Drosophila melanogaster* Meigen

Jedan od najbolje proučavanih primjera alternativnog prekrajanja pred-mRNA je onaj vezan za determinaciju spola kod vinske mušice *Drosophila melanogaster* Meigen. Primarni signal za određivanje spola vinske mušice *D. melanogaster* je omjer broja X kromosoma (X) u odnosu na broj setova autosoma (A). Jedinke koje imaju omjer X/A jednak 1, što obično proizlazi iz dva X kromosoma i dva seta autosoma, razvijaju se kao ženske jedinke, dok se jedinke koje imaju omjer X/A jednak 0,5, što obično proizlazi iz jednog X kromosoma i dva seta autosoma, razvijaju kao muške jedinke. Ovaj omjer broja X kromosoma i setova autosoma formira se u ranom stadiju razvoja jedinke i zapamćen je nakon toga u svakoj stanici. Naime, tri gena, putem svojih produkata, ključna su za prijenos genske informacije o ovom omjeru na mnoge druge gene, koji onda određuju muške i ženske osobine kod vrste *D. melanogaster*, a sam proces ovisi o kaskadno reguliranom izrezivanju RNA (Alberts i dr., 2007). Geni koji određuju spol na temelju omjera X/A, zbog fenotipa koji nastaje kada su mutirani, zovu se *sex-lethal* (Sxl), *transformer* (Tra) i *doublesex* (Dsx) geni. Funkcija ovih genskih produkata je prenijeti informaciju o omjeru X/A na ostale gene koji stvaraju spolna obilježja. Ti ostali geni funkcioniraju kao dva alternativna seta: oni koji navode na ženske i oni koji navode na muške značajke (Alberts i dr., 2007).

Muški razvojni put je zadani put, u kojem se geni Sxl i Tra konstitutivno transkribiraju, ali se RNA molekule degradiraju, dok se transkript Dsx izrezuje tako da proizvodi proteine koji isključuju gene za ženske spolne karakteristike. Omjer $X/A=1$ aktivira ženski razvojni put aktivirajući promotor unutar gena Sxl koji sintetizira posebne transkripte Sxl koji se potom konstitutivno izrezuju u funkcionalne proteine Sxl. Sxl je regulacijski protein s dva mjesta djelovanja: a) veže se za producirani transkript Sxl, uzrokujući žensko-specifično izrezivanje koje producira funkcionalni protein Sxl i b) veže se za konstitutivno producirani Tra transkript i uzrokuje njegovo alternativno prekrajanje što u konačnici dovodi do aktivnog regulacijskog proteina Tra. Protein Tra potom djeluje s konstitutivno proizvedenim proteinom Tra2 i dovodi do žensko-specifičnog cijepanja transkripta Dsx, pri čemu nastaje ženski oblik Dsx koji isključuje gene za muška obilježja (Slika 18.) (Alberts i dr., 2007; Voet i Voet, 2010).



Slika 18. Spol vrste *D. melanogaster* određen je alternativnim izrezivanjem tri gena

Muški razvojni put uključuje konstitutivno transkribiranje gena Sxl i Tra kao i degradaciju njihovih RNA transkripata, dok se transkript Dsx izrezuje na način da proizvodi protein koji isključuje gene za ženske spolne karakteristike

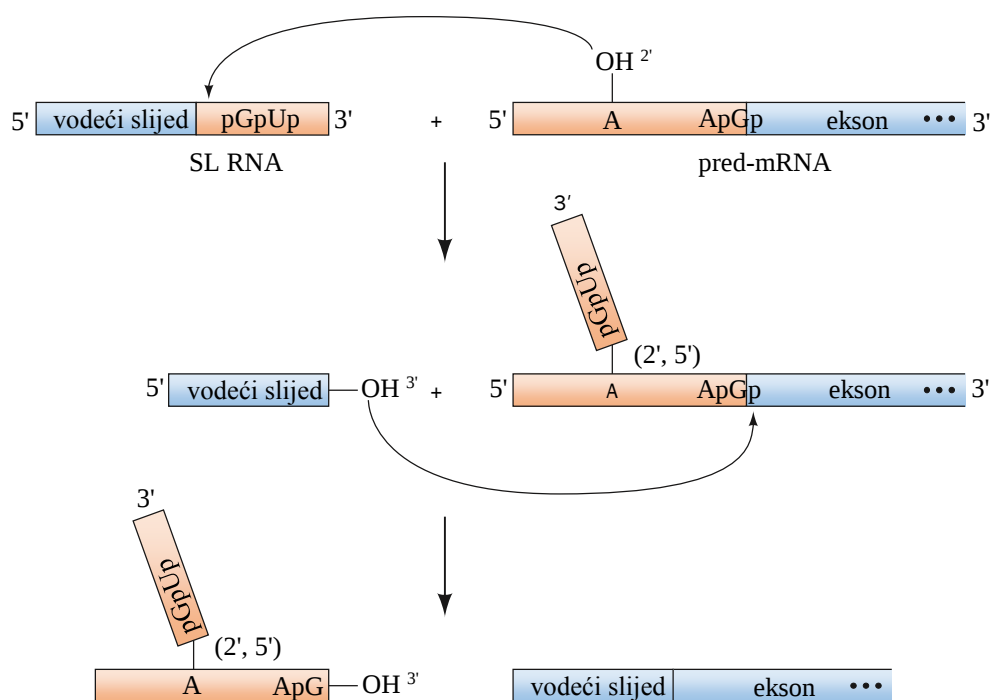
Ženski razvojni put aktivira promotor unutar gena Sxl i omogućuje sintezu posebnih transkripata Sxl koji se konstitutivno izrezuju u funkcionalne proteine Sxl. Protein Sxl potom uzrokuje žensko specifično izrezivanje unutar transkripta Sxl i konstitutivno se veže na transkript Tra čime potiče njegovo alternativno izrezivanje i nastanak aktivnog regulacijskog proteina Tra. Protein Tra zajedno s proteinom Tra2 dovodi do žensko-specifičnog cijepanja transkripta Dsx. Prilagođeno prema Alberts i dr., 2007.

Iako je determinacija spola jedan od najbolje proučavanih primjera regulacijske kaskade bazirane na izrezivanju RNA, i dalje nije jasno zašto kod vrste *D. melanogaster* postoji baš ovakav mehanizam. Određivanje spola mužjaka zahtjeva da se određen broj nefunkcionalnih molekula RNA stalno proizvodi, što se čini nepotrebnim gubitkom. Jedno objašnjenje je da izrezivanje RNA predstavlja ranu kontrolnu strategiju, odnosno ostatak iz rane evolucijske faze u kojoj je RNA bila dominantna biološka molekula, a kontrola ekspresije gena je bila gotovo u cijelosti na razini RNA-RNA interakcija (Alberts i dr., 2007).

3.3.4. Trans-izrezivanje

Nekolicina eukariotskih organizama, kao što su jednostanični tripanosom i višestanični nematodni crv, pokazuje određenu varijaciju prilikom izrezivanja introna (Alberts i dr., 2007). Naime, izrezivanje introna koje se događa unutar jedne te iste molekule RNA naziva se cis-izrezivanje, dok se izrezivanje introna i ligacija eksona koji se događaju između dva različita transkripta RNA naziva trans-izrezivanje (Voet i Voet, 2010). Tripanosom proizvodi sve svoje mRNA koristeći trans-izrezivanje, dok je ono kod nematoda zastupljeno sa svega 1% (Alberts i dr., 2007). Svi transkripti mRNA tripanosoma sadrže isti 35-nukleotidni nekodirajući vodeći slijed, koji nije prisutan u odgovarajućem genu, već je dio izrezujuće vodeće RNA (engl. *spliced leader*, *SL*) koja se transkribira s nezavisnog gena (Voet i Voet, 2010).

Mjesto prekrajanja na 5'-strani koje se nalazi iza SL RNA, mjesto grananja kao i mjesto prekrajanja na 3'-strani koje prethodi eksonu imaju istu sekvencu koja se nalazi u RNA izrezanoj pomoću kompleksa za prekrajanje (Slika 19.). SL RNA i pred-mRNA su spojene reakcijama trans-izrezivanja koje podsjećaju na cis-izrezivanje pomoću kompleksa za prekrajanje. Iako kod tripanosoma pred-mRNA nemaju introne, tripanosom sadrži U2 i U4/U6



Slika 19. *Mehanizam trans-izrezivanja*

2'-OH skupina adenina napada mjesto prekrajanja pri čemu nastaje međuprodukt u obliku slova Y. Potom 3'-OH skupina vodećeg slijeda napada ekson 2 i nastaje cjelovit produkt. Prilagođeno prema Voet i Voet, 2010.

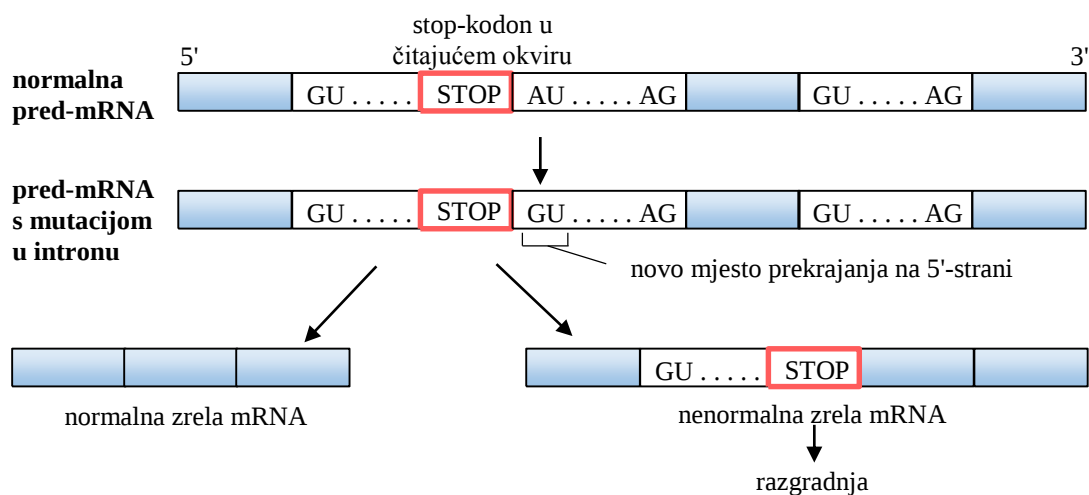
snRNP, ali nema U1 ni U5 snRNP. Međutim, postoje naznake da SL RNA vrši aktivnosti U1

snRNP prilikom trans-izrezivanja. Uz trans-izrezivanje, nematodi imaju i cis-izrezivanje i oba tipa izrezivanja vrše na istoj pred-mRNA. Također, postoji nekoliko naznaka da se trans-izrezivanje događa kod viših eukariota, ali ako se i događa, događa se na jako malom broju pred-mRNA i u jako malom postotku (Voet i Voet, 2010).

3.4. Mutacije povezane s procesom izrezivanja introna

Promjene u pred-mRNA, posebice u nekodirajućoj regiji, mogu utjecati na razinu transkripcije i osjetljivosti na degradaciju. Kako mjesto prekrajanja ovisi i o vrsti tkiva i o razvojnem stadiju, izbor mjesta prekrajanja mora biti striktno reguliran u prostoru i vremenu. Oko 15%, a neki smatraju čak do 50% genetskih bolesti kod čovjeka povezano je s točkastim mutacijama koje su rezultat krivog izrezivanja pred-mRNA. Neke od ovih mutacija deletiraju funkcionalno mjesto proteina, druge stvaraju novo mjesto prekrajanja koje se onda koristi umjesto normalnog mjesta prekrajanja, a neke se mutacije događaju i u kodirajućoj regiji *spliceosomske* mašinerije. Nadalje, napredovanje tumora korelira s promjenom razine proteina koji sudjeluju u odabiru alternativnog mjesta prekrajanja (Voet i Voet, 2010).

Mutacije možemo podijeliti na *cis*-djelujuće, tj. one u pred-mRNA, i *trans*-djelujuće, tj. one u faktorima prekrajanja. Primjer *cis*-djelujuće mutacije nalazimo u β -lancu hemoglobina, gdje *cis*-djelujuća mutacija može nastati na mjestu prekrajanja bilo s 5'-strane bilo s 3'-strane bilo kojeg od dvaju introna ili u eksonima. Posljedica mutacije jest pogrešno prekrojena mRNA



Slika 20. *Cis-djelujuća mutacija u β -lancu hemoglobina*

Mutacija A u G u prvom intronu gena za β -lanac ljudskog hemoglobina stvara novo mjesto prekrajanja na 5'-strani (GU). Oba mjesta prekrajanja na 5'-strani prepoznaje snRNP U1, pa prekrajanjem može nastati normalna zrela mRNA ili mutirana zrela mRNA koja sadržava intronske sekvence. Normalna zrela mRNA translata se u hemoglobinski β -lanac, dok se mutirana zrela mRNA razgrađuje jer, budući da sadržava intronske sekvence, nastaje preuranjeni stop-kodon. Prilagođeno prema Berg i dr., 2013.

s preuranjenim stop-kodonom i kao takva ne kodira za cjeloviti protein. Mutacije u mjestu

prekrajanja na 5'-strani introna mogu promijeniti to mjesto tako da ga prekrajajući kompleks ne prepozna već pronalazi drugo mjesto prekrajanja u intronu i tako otvara mogućnost nastanku preuranjenog stop-kodona. Također, mutacija može nastati u samom intronu i kao takva stvoriti novo mjesto prekrajanja, koje je slično kao i na 5'-strani introna, pa može doći do prepoznavanja bilo kojih od ta dva mjesta (Slika 20.) (Berg i dr., 2013).

Bolest pigmentozni retinitis, stečena sljepoća, nastaje kao posljedica *trans*-djelujuće mutacije, odnosno mutacije u faktorima prekrajanja. Bolest je posljedica mutacije u proteinu hPrp8 koji djeluje kao faktor prekrajanja i dio je kompleksa snRNP U4/U6.U5. Za sada još nije poznato kako mutacija u faktoru prekrajanja, koja je prisutna u svim stanicama, može uzrokovati bolest samo u mrežnici oka, ali je dobar primjer *trans*-djelujuće mutacije (Berg i dr., 2013).

3.5. Evolucija introna

Viši eukarioti, kao što su ptice i sisavci, u svom genomu imaju mnogo razlomljenih gena, dok je udio cjelovitih gena u nižih eukariota, kao što su kvasci, mnogo veći, a razlomljeni geni su sasvim rijetki kod prokariota (Berg i dr., 2013). Smatra se da su novi proteini tijekom evolucije nastali pregrupiranjem eksona koji kodiraju cjelovite strukturne elemente, vezna i katalitička mjesta. Takvo miješanje eksona brz je i efikasan način nastanka novih gena, budući da im na taj način funkcionalne jedinice ostaju očuvane, a omogućene su im nove interakcije (Berg i dr., 2013). Nadalje, introni su velika područja DNA u kojima se ona može slagati i rekombinirati uglavnom bez štete za kodirane proteine, dok bi nasuprot tome razmjena sekvenci unutar raznih eksona dovela do gubitka funkcije (Berg i dr., 2013). Još jedna velika prednost koju su višim eukariotima donijeli razlomljeni geni je mogućnost alternativnog prekrajanja koje je detaljno opisano u prethodnom poglavlju.

Postoje dva glavna alternativna objašnjenja o podrijetlu introna. Rani intronski model (engl. *intron-early*, IE) predlaže da su introni izuzetno stari, te da su bili brojni u eukariotskih i prokariotskih predaka (Roy i Gilbert, 2006). Prema tom modelu, opći sustav izrezivanja introna i povezivanja eksona razvio se prije odvajanja gljiva, biljaka i životinja, a tvrdnja je dokazana pokusom u kojem je stanični ekstrakt sisavaca uspješno povezao RNA iz kvasca (Berg i dr., 2013). U tom slučaju, introni su omogućavali modularno povezivanje jako ranih razlomljenih gena iz kraćih eksonskih fragmenata procesom koji nazivamo miješanje eksona (Roy i Gilbert, 2006). Usporedba sekvenci gena za proteine koji su izrazito očuvani tijekom evolucije upućuju

na to da su introni postojali u genima predaka, te da su izgubljeni tijekom evolucije organizama prilagođenih vrlo brzom rastu, kao što su prokarioti, što podupire ovu teoriju (Berg i dr., 2013). Suprotna teorija, odnosno kasni intronski model (engl. *intron-late*, IL), smatra da su originalni geni bili bez introna te da se sustav *spliceosomskih* introna razvio tek naknadno u eukariota i to nakon odvajanja eukariotske i prokariotske razvojne linije (Roy i Gilbert, 2006).

Položaj introna u nekim genima star je barem milijardu godina (Berg i dr., 2013). Otkriveno je da se 25% ljudskih introna nalazi na točno identičnom mjestu (između homolognih parova nukleotida prilikom sravnjivanja) kao introni ortolognih gena kod biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., dok se čak 40% intronskih pozicija kod gljive *Schizosaccharomyces pombe* Lindner. podudara s intronskim pozicijama vrsta koje ne pripadaju gljivama. S druge strane, 20-68% introna unutar vrste je specifično samo za tu vrstu. Ovi rezultati upućuju na značajan gubitak, odnosno dodavanje, introna u proteklih nekoliko stotina milijuna godina (Roy i Gilbert, 2006).

Mnogi introni grupe I i II su pokretni genetički elementi te ujedno kodiraju za endonukleazu pomoću koje se pomiču unutar genoma. Tijekom razmjene genetičkog materijala između dvije stanice, ili kada se strana DNA nađe u stanici domaćina nekim drugim načinom, te endonukleaze potiču umetanje introna na identično mjesto unutar homolognog gena one DNA koja ne sadrži intron. Introni grupe II kao intermedijer koriste molekulu RNA, za razliku od introna grupe I koji koriste DNA. Zanimljivo je također da endonukleaza koju kodiraju introni grupe II ima i aktivnost reverzne transkripcije pomoću koje se RNA prevodi u DNA prije ugradnje u genom. Struktura i mehanizam kojim se koriste mobilni introni podržava ideju da su neki introni nastali kao molekularni paraziti čija se evolucijska prošlost može pratiti do retrovirusa i transpozona (Nelson i Cox, 2008).

Smatra se da se prekrajanje pomoću kompleksa za prekrajanje razvilo iz RNA-kataliziranog samoprekrajanja upravo zbog velike kemijske sličnosti između prekrajanja introna grupe II i *spliceosomskih* introna, pri čemu bi upravo introni grupe II bili poveznica između samoprekrajanja introna grupe I i *spliceosomskog* prekrajanja kod viših eukariota (Berg i dr., 2013). Međutim, važno je napomenuti da sličnost između samoprekrajanja introna grupe II i *spliceosomskih* introna nije nužno posljedica zajedničke evolucije, već se možda radi o slučaju konvergentne evolucije (Berg i dr., 2013). Prema prvoj teoriji, kompleksi za prekrajanje su ribozimski sustavi čija se RNA komponenta razvila iz primordijske samoizrezujuće RNA, dok proteinske molekule služe prije svega kao okosnica kostura za izgradnju kompleksa za prekrajanje. Jednom kada intronski sljedovi više nisu morali sadržavati prekrajачko katalitičko

mjesto, omogućena im je puno veća sloboda, a samim time i puno bolja regulacija (Berg i dr., 2013).

Važno je uočiti da kompleks za prekranje ima sličnu građu i funkciju kao i ribosom, gdje proteinske molekule služe samo kao okosnica građe ribosoma, dok je katalitička moć pohranjena u molekuli RNA (Voet i Voet, 2010). Opažanje da nukleinske kiseline, a ne proteini, mogu upravljati vlastitom sintezom, da stanica sadrži mnogo proteina koji mogu manipulirati s DNA, a svega par koji mogu manipulirati s RNA, te da su mnogi koenzimi zapravo ribonukleotidi, npr. ATP, NAD^+ i CoA, dovelo je do hipoteze da su RNA molekule bile prvotni biološki katalizatori u predstaničnom vremenu, poznatom kao RNA svijet (Voet i Voet, 2010). Glavni događaj, u prijelasku s RNA na DNA svijet, bio je upravo prijenos katalitičke moći s molekule RNA na druge molekule, prije svega proteine (Berg i dr., 2013).

4. ZAKLJUČAK

Eukariotski geni su razlomljeni i sastoje se od introna i eksona. Njihovom transkripcijom nastaje primarni transkript iz kojeg se precizno izrezuju introni, a eksoni se povezuju i čine zrelu RNA. Eksoni zrele mRNA sadrže uputu za sintezu proteina. Udio introna varira među organizmima, pa tako prokariotski organizmi imaju jako malo introna unutar svog genoma, dok kod ljudi introni čine čak 25,9% genoma, a na eksone otpada svega 1,5% genoma. Introni se izrezuju u jezgri eukariotske stanice tijekom transkripcije molekule RNA, a proces se kontrolira fosforilacijskim stanjem CTD domene RNA-polimeraze II.

Intron se može izrezati samostalno, kao što je to slučaj kod introna grupe I i II, ili pri tome pomažu enzimi i brojni drugi proteini, kao što je to slučaj kod *spliceosomskih* introna. Izrezivanje introna je tkivno i vremenski specifično, pa se neki introni izrezuju samo u nekim tkivima, a neki samo u pojedinom stupnju razvoja organizma. Ovaj fenomen nazvan je alternativno prekrajanje introna, i temelj je proteinske raznolikosti eukariotskih organizama. Iako je sekvenciranjem genoma čovjeka ustanovljeno da on ima svega 23 000 gena, čak 95% strukturnih gena ima barem jedan način alternativnog prekrajanja molekula pred-mRNA. Zbog toga se kompleksnost organizma ne može procjenjivati samo na temelju broja njegovih gena, već se u obzir moraju uzeti i mnogu drugi čimbenici.

Mutacije mogu nastati unutar introna jednako kao što nastaju bilo gdje drugdje unutar genoma. Iako ne moraju uzrokovati problem, jer se intron ionako izrezuje iz primarnog transkripta, ako se dogode na mjestu bitnom za prekrajanje mogu uzrokovati jako velike probleme, primjerice stvaranje novog mjesta prekrajanja i nastanak preuranjenog stop kodona.

Rasprava oko evolucije introna i dalje traje, no danas se ipak smatra da su introni nastali rano tijekom evolucije života na Zemlji, ali su ih prokariotski organizmi, koji su prilagođeni vrlo brzom rastu, izgubili.

Zbog svega navedenog, introni su izuzetno bitni dijelovi molekule DNA, odnosno molekule RNA, i njihovo istraživanje je temelj razumijevanja kako evolucije tako i funkcionalnosti eukariotskog genoma. Zbog toga što pogrešnim izrezivanjem molekula pred-mRNA mogu nastati brojne bolesti, danas je istraživanju introna posvećeno jako mnogo znanstvenih radova i ulažu se znatni naponi za njihovo bolje razumijevanje.

5. LITERATURA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition. New York: Garland Science.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2013). *Biokemija*. 6. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko). Preveo Weygand Đurašević, I., Jernej, B., Kućan, Ž. Zagreb: Školska knjiga.
- Beyer, A.L., Osheim, Y.N. (1988). *Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts*. Genes & Development 2: 754-765.
- Cannone, J.J., Subramanian, S., Schnare, M.N., Collett, J.R., D'Souza, L.M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L.V., Müller, K.M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N., Gutell, R.R. (2002). *The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs*. BMC Bioinformatics 3: 2.
- Cioce, M., Lamond, A.I. (2005). *Cajal bodies: a long history of discovery*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21: 105-131.
- Das, R., Dufu, K., Romney, B., Feldt, M., Elenko, M., Reed, R. (2006). *Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly*. Genes & Development 20: 1100-1109.
- Dietrich, R.C., Peris, M.J., Seyboldt, A.S., Padgett, R.A. (2001). *Role of the 3' splice site in U12-dependent intron splicing*. Mol. Cell Biol. 21: 1942-1952.
- Dietrich, R.C., Incorvaia, R., Padgett, R.A. (1997). *Terminal intron dinucleotide sequences do not distinguish between U2- and U12-dependent introns*. Mol. Cell 1: 151-160.
- Galej, W.P., Nguyen, T.H., Newman, A.J., Nagai, K. (2014). *Structural studies of the spliceosome: zooming into the heart of the machine*. Curr. Opin. Struct. Biol. 25: 57-66.
- Hall, S.L., Padgett, R.A. (1996). *Requirement of U12 snRNA for in vivo splicing of a minor class of eukaryotic nuclear pre-mRNA introns*. Science 271: 1716-1718.
- Hall, S.L., Padgett, R.A. (1994). *Conserved sequence in a class of rare eucaryotic nuclear introns with non-consensus splice site*. J. Mol. Biol. 239: 357-365.
- Hastings, M.L., Resta, N., Traum, D., Stella, A., Guanti, G., Krainer, A.R. (2005). *An LKB1 AT-AC intron mutation causes Peutz-Jeghers syndrome via splicing at noncanonical cryptic splice sites*. Nat. Struct. Mol. Biol. 12: 54-59.

- Klingauf, M., Stanek, D., Neugebauer, K.M. (2006). *Enhancement of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling*. Mol. Biol. Cell 17: 4972-4981.
- Kruhlak, M.J., Lever, M.A., Fischle, W., Verdin, E., Bazett-Jones, D.P., Hendzel, M.J. (2000). *Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments*. J. Cell Biol. 150: 41-51.
- Levine, A., Durbin, R. (2001). *A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence*. Nucleic Acids Res. 29: 4006-4013.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M.P. (2012). *Molecular cell biology*. Seventh edititon. New York: W. H. Freeman.
- Misteli, T. (2005). *Concepts in nuclear architecture*. Bioessays 27: 477-487.
- Misteli, T. (2001). *The concept of self-rganization in cellular architecture*. J. Cell Biol. 155: 181-185.
- Moore, M.J., Query, C.C., Sharp, P.A. (1993). *Splicing of precursors to mRNA by the spliceosomes*. The RNA World 303-357.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2012). *Lehninger principles of Biochemistry*. Six edition. New York: W. H. Freeman.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008). *Lehninger principles of Biochemistry*. Fifth edition. New York: W. H. Freeman.
- Patel, A.A., Steitz, J.A. (2003). *Splicing double: insights from the second spliceosome*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 960-970.
- Patel, A.A., McCarthy, M., Steitz, J.A. (2002). *The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression*. EMBO J. 21: 3804-3815.
- Phair, R.D., Misteli, T. (2000). *High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus*. Nature 404: 604-609.
- Roy, S.W., Gilbert, W. (2006). *The evolution of spliceosomal introns: patters, puzzles and progress*. Nat. Rev. Genet. 7: 211-221.
- Rino, J., Carmo-Fonseca, M. (2009). *The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus?* Trends Cell Biol. 19: 375-384.

- Rino, J., Carvalho, T., Braga, J., Desterro, J.M., Lührmann, R., Carmo-Fonseca, M. (2007). *A stochastic view of spliceosome assembly and recycling in the nucleus*. PLoS Comput. Biol. 3: 2019-2031.
- Ritchie, D.B., Schellenberg, M.J., MacMillan, A.M. (2009). *Spliceosome structure: Piece by piece*. Biochim. Biophys. Acta 1789: 624-633.
- Stanek, D., Neugebauer, K.M. (2006). *The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze*. Chromosoma 115: 343-354.
- Tarn, W.Y., Steitz, J.A. (1996a). *A novel spliceosome containing U11, U12 and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro*. Cell 84: 801-811.
- Tarn, W.Y., Steitz, J.A. (1996b). *Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns*. Science 273: 1824-1832.
- Voet, D., Voet, J.G. (2010). *Biochemistry*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Wahl, M.C., Will, C.L., Lührmann, R. (2009). *The spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine*. Cell 136: 701-718.
- Wetterberg, I., Zhao, J., Masich, S., Wieslander, L., Skoglund, U. (2001). *In situ transcription and splicing in the Balbiani ring 3 gene*. EMBO J. 20: 2564-2574.
- Will, C.L., Lührmann, R. (2005). *Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome*. Biol. Chem. 386: 713-724.

6. SAŽETAK

Introni su dijelovi DNA, odnosno RNA, koji se izrezuju iz primarnog transkripta i ne kodiraju za polipeptidni lanac. Izrezivanje može biti katalizirano samim intronom ili pak ribonukleoproteinskim kompleksom, a događa se tijekom transkripcije molekule RNA. Iako su u prošlosti smatrani nepotrebnim dijelovima genoma koji samo zauzimaju dragocjeni prostor unutar DNA, imaju iznimnu ulogu u regulaciji ekspresije gena pomoću alternativnog prekrajanja.

U ovom seminarskom radu su prikazani ključni koraci posttranskripcijskih modifikacija preteče molekula mRNA, osnovne karakteristike introna, njihova uloga i načini izrezivanja iz različitih preteča molekula RNA. Uz navedeno, velika pozornost je posvećena mehanizmima alternativnog prekrajanja molekula pred-mRNA koji je jedan od glavnih izvora proteinske raznolikosti eukariotskih organizama. Dio rada posvećen je i mutacijama koje se mogu dogoditi unutar introna, a koje mogu bitno promijeniti osnovno značenje molekule mRNA, kao i bolestima koje pri tome nastaju. I na kraju, prikazane su dvije hipoteze o postanku introna i međusobnim sličnostima i razlikama između introna različitih grupa.

7. SUMMARY

Introns are parts of the DNA, and consequently RNA, that are spliced from the primary transcript and do not encode for a polypeptide chain. Splicing can be catalyzed by introns alone or by a ribonucleoprotein complex, and occurs during RNA transcription. Although in the past they were considered unnecessary parts of the genome that are just taking up valuable space inside the DNA they have extraordinary role in the regulation of gene expression by alternative splicing.

This thesis presents key steps of posttranscriptional modifications of RNA precursors, basic characteristics of introns, their role and ways of splicing from different RNA precursors. In addition, much attention is devoted to the mechanisms of alternative pre-mRNA splicing which is one of the main sources of protein diversity of eukaryotic organisms. Also, part of the work is devoted to the mutations that can occur within an intron, which may significantly change the basic meaning of the molecule, as well as diseases that have origin in introns. And finally, two hypotheses on the origin of introns are given with mutual similarities and differences between different groups of introns.