Posttranskripcijsko procesiranje primarnog transkripta za tRNA

Čavka, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:408751

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

POSTTRANSKRIPCIJSKO PROCESIRANJE PRIMARNOG TRANSKRIPTA ZA tRNA

POST-TRANSCRIPTIONAL PROCESSING OF tRNA PRECURSOR MOLECULE

SEMINARSKI RAD

Ivana Čavka
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 4

2. STRUKTURA MOLEKULE tRNA 6

2.1.Kanonska struktura molekule tRNA 6

2.2.Odstupanje od standardne 2D strukture tRNA 7

3. PROCESIRANJE 5' KRAJA 8

3.1.Cijepanje 5'-vodećeg slijeda 8

3.2.tRNA^{His} 11

4. PROCESIRANJE 3'-KRAJA 12

4.1.Cijepanje 3'-pratećeg slijeda 12

4.2.Dodavanje slijeda CCA na 3'-kraj 15

5. IZREZIVANJE INTRONA 16

5.1.Raznolikost gena za tRNA u odnosu na sadržaj introna 16

5.2.Prekrajanje primarnih transkripata za tRNA kod eukariota 18

5.3.Prekrajanje primarnih transkripata za tRNA kod arheja 20

5.4.Dvodjelne i trodjelne tRNA 20

5.5.Permutirana tRNA 22

6. MODIFIKACIJE NUKLEOTIDA 22

6.1.Uloge posttranskripcijskih modifikacija ribonukleotida 23

6.2.Pozicija, učestalost i očuvanost posttranskripcijskih modifikacija ribonukleotida unutar molekule tRNA 26

6.3.Putevi biosinteze modifikacija 30

Metilacija RNA:metiltransferazama 30

Derivati m^5U_{34} 32

Biosinteza modifikacija koje zahtijevaju tiolaciju 33

Modifikacije tRNA-gvanin-transglikozilazama 33

Sinteza pseudouridina 33

Biosinteza univerzalne modifikacije N^6-treonilkarbamoiladenozin (t^6A) 35

Modifikacija adenozina u inozin 35

Modifikacija citidina u uridin 35

Formiranje vibutozina 36

7. PROCESIRANJE PRIMARNOG TRANSKRIPTA ZA tRNA I LJUDSKE BOLESTI 37

8. PUTOVANJE MOLEKULE tRNA KROZ EUKARIOTSKU STANICU TIJEKOM BIOGENEZE 38

8.1 Izlazak tRNA iz jezgre 38
8.2 Retrogradni transport tRNA 40
8.3 Ponovni izlazak iz jezgre 41
8.4 Unos molekule tRNA u mitohondrij 41
9. LITERATURA 42
10.SAŽETAK 44
11.SUMMARY 45

1. UVOD

RNA-polimeraza II, u procesu transkripcije, prepisuje gene u molekulu glasničke RNA (mRNA) koja se potom, u procesu translacije, prevodi u jezik aminokiselina što rezultira nastankom proteina. Nastali proteini vrše različite uloge u stanici, od strukturne do katalitičke. Ipak, ne rezultiraju svi procesi transkripcije gena molekulom mRNA. Geni mogu kodirati i za molekule RNA koje vrše različite uloge u stanici. Tako postoje geni za molekule rRNA, koje su sastavni dio ribosoma, i molekule tRNA koje su zajedno s rRNA i mRNA glavni akteri translacije. Osim njih tu su i različite vrste malih molekula RNA koje sudjeluju u utišavanju gena i molekule RNA koje sudjeluju u procesiranju eukariotskih transkripata, bilo da je riječ o prekrajanju primarnog transkripta u sklopu kompleksa za prekrajanje (engl. *splicesome*) - snRNA ili modificiranja nukleotida – snoRNA. Neovisno o njihovoj budućnosti u stanici, gotovo svi produkti transkripcije moraju proći kroz nekakav oblik posttranskripcijskog procesiranja kako bi sazreli u funkcionalne molekule sposobne za izvršavanje zadane uloge u stanici.

Glavna uloga molekula tRNA u stanici je dostavljanje odgovarajućih aminokiselina na ribosom prilikom sinteze proteina u procesu translacije. Naime, na 3'-kraj molekule tRNA enzim aminoacil-tRNA-sintetaza dodaje odgovarajuću aminokiselinu katalizirajući nastanak esterske veze (Voet i Voet, 2011.). Potom takva, aminoacilirana, molekula tRNA odlazi na ribosom gdje predaje aminokiselinu u rastući, polipeptidni lanac. Osim uloge u translaciji pokazano je kako tRNA ima i druge, dodatne uloge u stanici. Tako tRNA sudjeluje u regulaciji apoptoze vezujući citokrom C, signalizaciji u općem kontrolnom putu aminokiselina, označavanju proteina za degradaciju i dr. (Hopper, 2013.). Nadalje, otkriveno je i kako fragmenti nastali cijepanjem tRNA sudjeluju u regulaciji translacije i odgovoru stanice na stres (Sobala i Hutvagner, 2011.). Tokom svog života u stanici molekula tRNA mora stupati u interakcije s drugim biomolekulama. Ostvarivanje ovih interakcija važno je za pravilno funkcioniranje stanice. Jedan od najboljih primjera važnosti ostvarivanja pravilnih interakcija je svakako prepoznavanje molekule tRNA od strane odgovarajuće aminoacil-tRNA-sintetaze. Naime, interakcijama između enzima i odgovarajuće mu molekule tRNA vrši se provjera ispravnog uparivanja aminokiseline i antikodona. Kako je to jedina provjera ovog uparivanja, ukoliko dođe do pogreške, na ribosomu će se u nastajući polipeptid ugraditi pogrešna aminokiselina (Voet i Voet, 2011.). Može se zaključiti kako za normalno obavljanje svojih uloga i prepoznavanje od aminoacil-tRNA-sintetaze i drugih proteina, tRNA mora imati

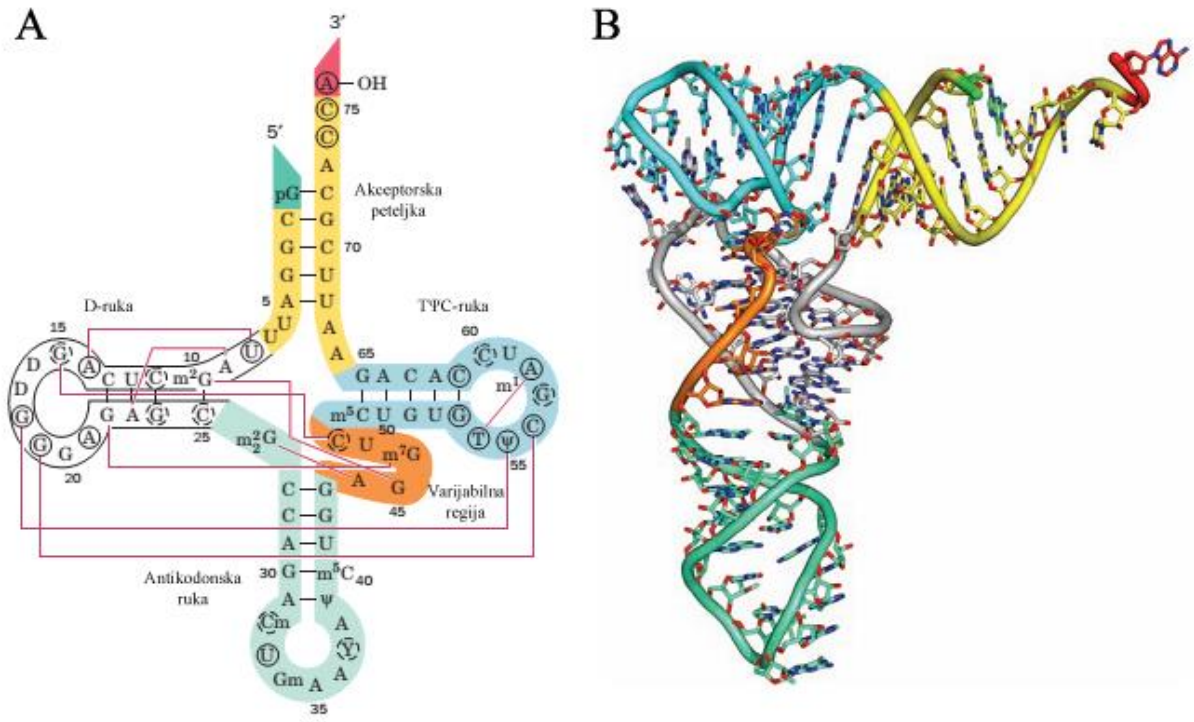
ispravnu konformaciju. Od prepisivanja do nastanka zrele, funkcionalne molekule tRNA ispravne konformacije, dug je put.

Prepisivanje gena za tRNA RNA-polimerazom III rezultira nastankom primarnog transkripta koji se uvelike razlikuje od zrele, funkcionalne molekule tRNA. Zbog ove razlike primarni transkript, mora podleći posttranskripcijskom procesiranju. Procesiranje se odvija u nekoliko koraka: procesiranje 5'- i 3'- krajeva, izrezivanje introna, modificiranje nukleotida. Ovi koraci ne moraju se nužno odvijati ovim redoslijedom, a kod eukariota se mogu odvijati i u različitim staničnim odjeljcima. Put molekule tRNA po stanici eukariota tijekom njene biogeneze najbolje je razjašnjen na primjeru kvasca (Hopper, 2013.). Posttranskripcijsko procesiranje transkripta za tRNA je, u različitom obliku, prisutno u svim domenama života. (Su i Randau, 2011.). Međusobne sličnosti i razlike mogu poslužiti kao evolucijske odrednice koje ukazuju na stupanj srodnosti pojedinih skupina. Iako razlike postoje, jedno pravilo vrijedi kod svih organizama, neovisno o načinu procesiranja, a to je da pogreške u procesiranju dovode do nemogućnosti normalnog funkcioniranja produkta –molekule tRNA. Zbog spomenute važnosti uloga molekule tRNA za stanicu, pogreške u procesiranju primarnih transkripata za tRNA vode pojavi različitih ljudskih bolesti poput različitih neurodegenerativnih bolesti, a povezuju se i s pojavom tumora te dijabetesom (Hori, 2014.). Kod patogena pak promjene u procesiranju mogu utjecati na infektivnost i mogućnost imunostimulacije (Abott, 2016.). Rad nudi kratak uvod u svaki od ovih procesa uz navedene najbolje poznate primjere iz tri domene (arheje, bakterije, eukarioti), a uz glavnu temu obrađene su i one usko povezane uz procesiranje poput raznolikosti gena za tRNA i putovanja molekula tRNA kroz eukariotsku stanicu tijekom biogeneze.

2. STRUKTURA MOLEKULE tRNA

2.1. Kanonska struktura molekule tRNA

Molekule tRNA su prepoznatljive po svojoj specifičnoj sekundarnoj i tercijarnoj strukturi. Sekundarna struktura može se podijeliti u šest poddomena koje zajedno čine karakterističan izgled lista djeteline (Sl. 1A). Poddomene su nazvane prema funkcijama, koje vrše, ili strukturnim karakteristikama koje posjeduju. Tako možemo razlučiti akceptorsku peteljku koja se sastoji od 7 bp i dodatnog slijeda CCA na 3'-kraju koji je važan za aminoaciliranje molekule tRNA. Na 5'-kraju se nalazi nukleotid (pN_1) koji se sparuje s nukleotidom (N_{73}) smještenim tik uzvodno od slijeda CCA. Iznimku od ovog pravila čine molekule $tRNA^{His}$ koje imaju karakterističan gvanin (G_{-1}) koji se dodaje naknadno ili je kodiran genomom (Heinenann i sur., 2009.). Nadalje, nukleotidi U_8 i N_9 čine slijedeću poddomenu – poveznicu (engl. *connector*). Poveznica se nalazi između akceptorske peteljke i D-ruke. D-ruka se sastoji od peteljke i omče, a uključuje nukleotide od 10. do 25. položaja. Svoj naziv je dobila prema modifikaciji dihidrouridin koja se može nalaziti na različitim pozicijama unutar ove poddomene. Karakteristike D-ruke su i A_{14} te R_{15} (purin na poziciji 15). Četvrta poddomena je antikodonska ruka koja se također sastoji od peteljke (5 bp) i omče (7 nt). Na njezinoj omči se nalazi antikodonski triplet koji je karakterističan za svaku vrstu molekule tRNA i služi za prepoznavanje odgovarajućeg kodona u procesu translacije. Sljedeća je poddomena zanimljiva jer se prema njoj molekule tRNA razvrstavaju u dva razreda. Radi se o varijabilnoj regiji koja se kod molekula tRNA razreda I sastoji od 4-5 nt, a kod pripadnika razreda II ($tRNA^{Leu}$, $tRNA^{Ser}$ i bakterijska $tRNA^{Tyr}$) od čak 24 nt. Posljednja poddomena je TΨC-ruka koja je ime dobila prema modifikacijama koje se nalaze u njezinoj omči (7 nt). Radi se o često prisutnima T_{54} (timidin), Ψ_{55} (pseudouridin), a uz njih česti su i C_{56}, A_{58}. Uz omču, sastavni dio TΨC-ruke je i peteljka (5 bp) bogata GC parovima. Tercijarna struktura molekula tRNA je oblika slova L (Sl. 1B). Njezinu konformaciju održavaju neobične interakcije nukleotida iz različitih poddomena. Svojim međusobnim interakcijama 12 od 23 očuvana ili djelomično očuvana nukleotidna ostatka molekule tRNA sudjeluju u spomenutom očuvanju L oblika molekule tRNA (Giegé i sur., 2012.). Na Sl. 1A su na primjeru kvaščeve $tRNA^{Phe}$ prikazane interakcije unutar molekule tRNA koje stabiliziraju tercijarnu strukturu. Ova sparivanja, uglavnom, nisu u skladu s Watson-Crickovim pravilom sparivanja (AT, GC), već se radi o povezivanju riboze i baze, Hoogsteenovom sparivanju i dr.



Slika 1. A) Sekundarna i B) tercijarna struktura molekule tRNA prikazane na primjeru kvaščeve $tRNA^{Phe}$ s naznačenim interakcijama koje sudjeluju u stabilizaciji tercijarne strukture. Punim krugom označeni su očuvani nukleotidi dok su isprekidanim naznačene pozicije na kojima je očuvana vrsta baze (purin ili pirimidin). Prilagođeno i preuzeto iz Voet i Voet, 2011.

2.2. Odstupanje od standardne 2D strukture tRNA

Spomenuto je kako postoje dva razreda molekula tRNA koja se međusobno razlikuju po dužini varijabilne regije. U razred II spadaju one vrste molekula tRNA koje imaju dugačku varijabilnu regiju i, uglavnom, su se do 2012. godine spominjale tri poznate vrste ovakvih molekula tRNA ($tRNA^{Leu}$, $tRNA^{Ser}$ i bakterijska $tRNA^{Tyr}$). U istraživanju provedenom te godine otkriveno je čak 100 novih molekula tRNA (nev-tRNA od engl. *nematode-specific V-arm-containing tRNA*) s dugom varijabilnom regijom čiji elementi za prepoznavanje od strane aminoacil-tRNA-sintetaza podsjećaju na one kod pripadnika razreda II (Fujishima i Kanai, 2014.). Sve novootkrivene molekule pronađene su kod pripadnika skupine oblića (Nematoda), a primijećeno je kako su u stanicama zastupljene u manjoj količini od kanonskih oblika koji imaju isti antikodon. Antikodoni koje nose nev-tRNA uglavnom su oni rjeđe korišteni za kodiranje određene aminokiseline. Godine 2014. ovakve molekule tRNA pronađene su i kod drugih organizama uključujući primate, vinsku mušicu, kvasac, enterobakterije iz crijevne mikroflore i dr. (Rogers i Griffiths-Jones, 2014.).

Određen broj mitohondrijskih molekula tRNA također pokazuje odstupanje od kanonskog oblika. Ovakve molekule tRNA su do sada pronađene kod višestaničnih životinja (Metazoa), a njihova prepoznatljiva karakteristika je nedostatak D ili TΨC ruke. Pretpostavlja se kako su tRNA bez D-ruke starije od onih bez T-ruke, jer su šire rasprostranjene unutar skupine višestaničnih životinja (Fujishima i Kanai, 2014.).

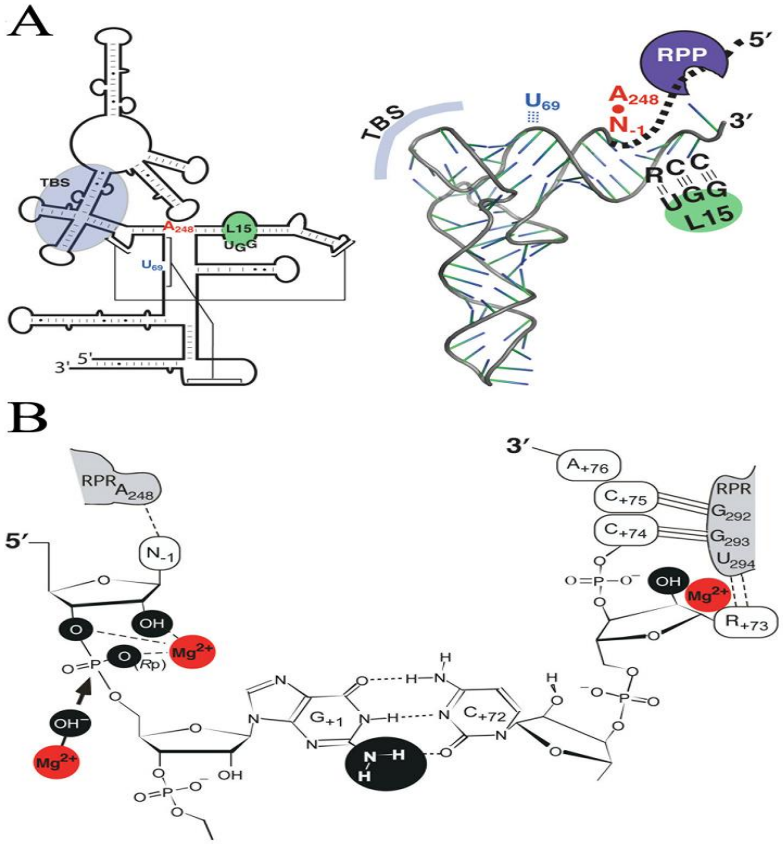
3. PROCESIRANJE 5' KRAJA

3.1. Cijepanje 5'-vodećeg slijeda

Većina primarnih transkripata za tRNA posjeduje 5'-vodeći slijed kojeg je potrebno izrezati. Uklanjanje 5'-vodećeg slijeda katalizira enzim RNaza P (Hopper, 2013.). Reakcija, uglavnom, rezultira nastankom prekursorske molekule tRNA s monofosfatom na 5'-kraju i uklonjenim slijedom s terminalnim 2'-3' glikolom (Shepherd i Ibba, 2015.). Smatra se kako ovaj prastari enzim, danas prisutan u organizmima iz sve tri domene života, datira iz doba RNA-svijeta. Do današnjeg je dana ovaj enzim, uz nekoliko poznatih iznimki, uglavnom, očuvan kao ribonukleoprotein (Phizicky i Hopper, 2010.). Kod većine poznatih RNaza P glavnu katalitičku ulogu ima RNA komponenta enzima dok proteinski dio enzima, čiji sastav varira od skupine do skupine, rijetko preuzima glavnu ulogu u katalizi. Za razliku od većine velikih ribozima RNaza P, slično kao i ribosomi, može uzastopno katalizirati veći broj reakcija (Shepherd i Ibba, 2015.).

Bakterijska RNaza P sastoji se od katalitičke RNA i malenog bazičnog proteina. Katalitička uloga RNA komponente prvi put je otkrivena 1983. godine kada je pokazano kako uspješno katalizira cijepanje transkripta i bez prisutnosti proteina. Utvrđeno je i kako se radi o S_N2 mehanizmu nukleofilne supstitucije koji se temelji na stabilizaciji prijelaznog stanja u obliku trigonske bipiramide. Nužan kofaktor ove katalitičke reakcije je magnezijev ion (Mg^{2+}) koji koordinira fosfatnu okosnicu supstrata i aktivira nukleofilni hidroksilni ion, dok 2'-hidroksilna skupina primarnog transkripta donira proton izlazećem 3'-atomu kisika (Sl. 2). (Lai i sur., 2010.). Proteinska komponenta RNaze P tvori neobičnu strukturu *β-α-β crossover* lijeve orijentacije koja ima pozitivno nabijeno lice. Pozitivno lice strukture omogućuje interakciju s RNA komponentom koja je zbog svoje fosfatne okosnice negativno nabijena (Shepherd i Ibba, 2015.). Među ostale uloge proteinske komponente spadaju sudjelovanje u ostvarivanju interakcija s 5'-vodećim slijedom primarnog transkripta i povećanju brzine reakcije koju katalizira RNA komponenta. Osim toga, proteinska komponenta omogućuje i katalitičko

djelovanje RNA komponente pri fiziološkoj koncentraciji magnezijevih iona (Lai i sur. 2010.). Kod bakterija su zabilježena dva tipa RNaze P. Tip A je široko rasprostranjen oblik, prisutan među različitim bakterijskim skupinama, dok je tip B ograničen na skupinu gram-pozitivnih bakterija. Oba tipa dijele sačuvanu je katalitičku srž, s očuvanim ostacima bitnima za katalizu, i oblik tercijarne strukture (Shepherd i Ibba, 2015.).



Slika 2. Prepoznavanje supstrata i mehanizam katalize bakterijske RNaze P. (A) Sekundarne strukture katalitičke RNA RNaze P (lijevo) i primarnog transkripta za tRNA (desno) iz bakterije *E.coli* uz prikaz domeni potrebnih za ostvarivanje interakcija prilikom katalize koju provodi RNaza P. Naznačena je i interakcija vodećeg slijeda s proteinskom komponentom RNaze P (RPP). TBS označava vezno mjesto za TΨC-ruku transkripta. (B) Prikaz uobičajenog aktivnog mjesta RNaze P. Crno su označene kemijske skupine, a crveno magnezijevi ioni za koje se smatra da doprinose katalizi. Strelica označava napad magnezijevim ionom aktiviranog hidroksidnog nukleofila na fosfat. Preuzeto iz Lai i sur., 2010.

Arhejska RNaza P je također ribonukleoprotein, no, za razliku od bakterijske, sadrži 4 ili više proteinski komponenti koje pokazuju homologiju s komponentama eukariotske RNaze P. Eukariotske RNaze P sadrže još više proteinskih komponenti. Tako kvaščeva RNaza P ima devet (Pop1, Pop3-8, Rpp1 i Rpp2), a ljudska deset proteinskih komponenti (Phizicky i Hopper, 2015.). Kod kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, je dokazano da RNaza P, zajedno s ranim transkriptima koji sadrže 5'-vodeći slijed, lokalizirana u jezgrici. Otkriveno je i da RNaza P

stupa u interakciju s RNA-polimerazom III preko transkripcijskog faktora TFIIIB što bi moglo upućivati na istovremenost transkripcije i procesiranja 5'-kraja. Kod višestaničnih životinja lokalizacija RNaze P još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (Hopper, 2013). Osim razlike u proteinskim komponentama, eukariotske se RNaze P od bakterijskih razlikuju i u regijama katalitičke RNA koje su povezane sa stabilnošću i katalitičkim djelovanjem same RNaze P. Potvrđeno je da se i ovdje radi o ribozimu, ali je u pogledu enzimske kinetike reakcija uklanjanja vodećeg slijeda mnogo sporija u odnosu na bakterijski kada se promatra katalitička aktivnost gole RNA u *in vitro* uvjetima (Phizicky i Hopper, 2015.). Ovaj podatak upućuje na veću važnost eukariotskih proteinskih komponenti u stimulaciji katalize u odnosu na važnost bakterijskih. Slična važnost stimulacijskog djelovanje proteinskih komponenti zabilježena je i kod arheja (Tsai i sur., 2006.).

Osim uloge u procesiranju 5- kraja primarnog transkripta za tRNA, Rnaza P procesira i druge supstrate. Tako je kod kvasca otkriveno da Rnaza P sudjeluje u procesiranju C/D kutije male jezgričine RNA (snoRNA) i u procesiranju HRA1 nekodirajuće RNA. Kod kralježnjaka je ustanovljeno kako procesira MALAT RNA i Men β transkript (Phizicky i Hopper 2015.). Budući je esencijalna za normalno funkcioniranje stanice, RNaza P se pokazala kao obećavajuća meta novih antibiotika. Naime, istraživanja su potvrdila njezinu strukturnu i funkcionalnu raznolikost između filogenetskih skupina. Tako je otkriveno da RNaza P iz ljudskih mitohondrija ne sadrži RNA komponentu (Phizicky i Hopper, 2015.), a isto je pokazano i za RNaze P iz jezgre, mitohondrija i plastida uročnjaka kao i za jezgrinu RNazu P organizma *Trypanosoma brucei* (Drainas, 2016.). Značajnost otkrića različitosti RNaza P iz eukariotskih i bakterijskih stanica leži upravo u otvaranju mogućnosti pronalaska novih vrsta antibiotika čija bi meta bio upravo ovaj enzim (Drainas, 2016.; Klemm u sur., 2016.).

Do sada je bilo riječi o procesiranju 5' kraja transkripta koji nosi prepisani gen za samo jednu molekulu tRNA. U slučajevima kada se radi o transkriptima s više prekursora za tRNA ili tRNA i rRNA izrezivanju RNaze P često prethodi procesiranje drugim endoribonukleazama poput RNaze E ili RNaze III. Nastale, kraće prekursorske molekule RNaza P može efikasno procesirati generirajući zrele 5'-krajeve (Shepherd i Ibba, 2015.). Iako većina bakterijskih policistronskih transkripata slijedi ovaj obrazac procesiranja kod bakterije *Escherichia coli* je otkriveno kako, u nekim slučajevima, sama RNaza P može vršiti funkciju razdvajanje prekursora iz zajedničkog transkripta (Shepherd i Ibba, 2015.). Zabilježen je i slučaj gdje RNaza P procesira 3'-kraj molekule odvajajući prekursore za tRNA jedan po jedan. U ovom slučaju

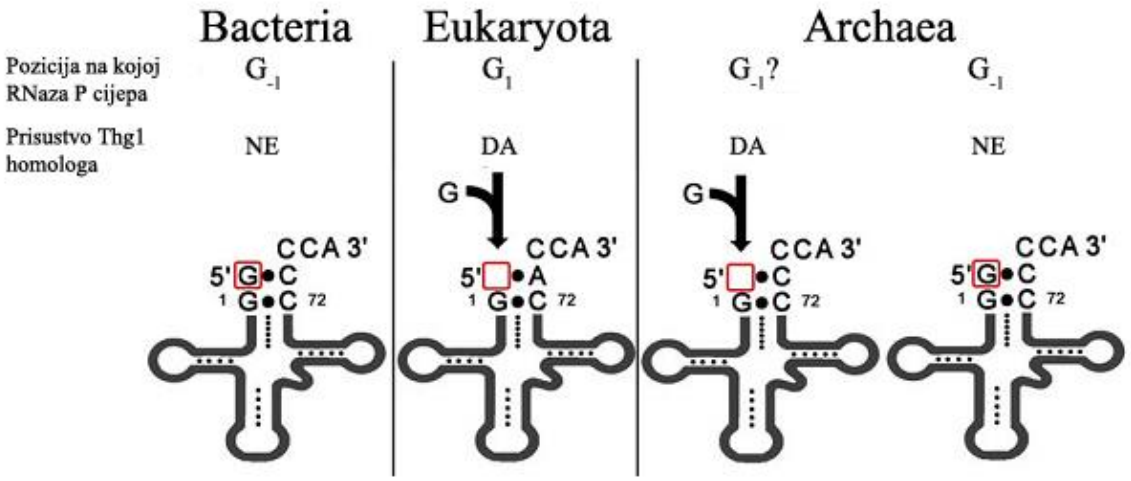
RNaza P djeluje u smjeru od 3' prema 5', a aktivnost je inicirana endoribonukleaznim uklanjanjem Rho-neovisnog terminatora transkripcije (Agrawal i sur., 2014)

Duže vrijeme je bilo prihvaćeno kako je RNaza P sveprisutan enzim za procesiranje 5' kraja, no do danas je računalnom analizom pokazano kako ona vjerojatno nedostaje kod organizama *Nanoarchaeum equitans, Pyrobaculum aerophylum* i *Aquifex aeolicus* (Phizicky i Hopper, 2015.). Za *Nanoarchaeum equitans* je 2008. godine isto potvrđeno i biokemijskom analizom. Istraživanje je pokazalo kako je promotor gena za tRNA precizno pozicioniran tako da transkripcija rezultira transkriptom bez 5' vodećeg slijeda. Osim toga na početku gena za tRNA na poziciji -1 nalazi se dodatni purinski ostatak kako bi se dodatno osiguralo mjesto inicijacije transkripcije za koju je poznato kako započinje na mjestu s purinskom bazom. Nedostatak RNaze P potvrđuje i trifosforilirani 5' krajevi molekula tRNA ovog organizma. Arheja *N. equitans* posjeduje iznimno malen genom što bi moglo upućivati na činjenicu da je potreba za redukcijom genoma dovela do gubitka gena za RNazu P (Heinemann i sur., 2010.).

3.2. tRNA^{His}

Karakteristika $tRNA^{His}$, prema kojoj je prepoznaje histidil-tRNA sintetaza (HisRS), je gvanozin s 5'-fosfatom na poziciji -1. Poznate su dvije strategije koje osiguravaju prisutnost G_{-1} (Sl. 3) Kod većine bakterija prisutnost G_{-1} osigurana je njegovim kodiranjem u genu za $tRNA^{His}$. Bakterijska RNaza P, koja inače cijepa lanac primarnog transkripta za tRNA na 1 poziciji, u tom slučaju to čini na poziciji -1 ne izrezujući gvanozin potreban za normalno funkcioniranje $tRNA^{His}$ (Heinenann i sur., 2009.). Kod eukariota je pak zabilježena drugačija strategija. Oni, naime, imaju enzim $tRNA^{His}$-gvanilil-transferazu (Tgh1) koji dodaje karakteristični G_{-1} nasuprot A_{73} ili C_{73} nakon uklanjanja 5'-vodećeg slijeda (Heinenann i sur., 2009.). Zanimljivost Thg1 enzima je u tome što nukleotide dodaje u 3'-5' smjeru mehanizmom koji je ovisan o kalupu. Ovaj smjer dodavanja nukleotida je suprotan u odnosu na smjer dodavanja ostalih poznatih polimeraza (Phizicky i Hopper, 2015.). Nadalje, kod arheja su zastupljene obje strategije. Pojedine su se skupine arheja, uglavnom, opredijelile za jednu od dvije strategije, no pripadnici skupine Methanosarcinales imaju eksprimiran homolog enzima Thg1 iako imaju genomom kodiran G_{-1} (Heinenann i sur., 2009.). Osim toga neki homolozi Thg1 kod arheja prema kalupu dodaju uridin i gvanozin koje redom sparuju s A_{73} i C_{73}, ali nisu u mogućnosti dodati G_{-1} nasuprot A_{73}. U *in vitro* uvjetima Thg1 može katalizirati višestruku adiciju nukleotida u 3'-5' smjeru mehanizmom koji ovisi o kalupu (Hopper, 2013.). Ova zapažanja upućuju kako je originalna uloga proteina iz obitelji Thg1 bila dodavanje nukleotida

u 3'-5' smjeru u ovisnosti o kalupu (Phizicky i Hopper, 2015.). Otkriveno je i kako $tRNA^{His}$ organizama iz odjeljka α-proteobakterija ne sadrže G_{-1}. Ove bakterije, u skladu s navedenim, imaju i HisRS koje za prepoznavanje $tRNA^{His}$ ne zahtijevaju prisutnost G_{-1} (Phizicky i Hopper 2015.). Ovaj fenomen kasnije je zapažen i u domeni eukariota u organizama poput *Acanthamoeba castellani* i *Trypanosoma brucei* kod kojih nije pronađen Thg1 homolog. Citoplazmatska HisRS ovih organizama također uspješno prepoznaje i aminoacilira $tRNA^{His}$ bez G_{-1}, ali u primarnoj strukturi ne pokazuju sličnost s HisRS spomenutih bakterija, što sugerira alternativni mehanizam kojim je postignuta specifičnost za neuobičajen supstrat (Betat



Slika 3. Strategije koje osiguravaju prisutnost G_{-1} kod $tRNA^{His}$. Karakteristični G_{-1} je kod većine bakterija očuvan zahvaljujući neuobičajenom djelovanju RNaze P koja primarni transkript za $tRNA^{His}$ cijepa na položaju -1. Kod eukariota je G_{-1} dodan posttranskripcijski djelovanjem $tRNA^{His}$-gvanililtransferaze (Thg1), dok su kod arheja prisutne obje strategije, a neke imaju ekprimiran homolog enzima Thg1 iako imaju genomom kodiran G_{-1}. Preuzeto i preuređeno prema Heinenann i sur. 2009.

i sur., 2014.).

4. PROCESIRANJE 3'-KRAJA

4.1. Cijepanje 3'-pratećeg slijeda

Uz iznimku procesiranja primarnog transkripta za $tRNA^{Trp}$, uklanjanje 3'-pratećeg slijeda obično slijedi nakon uklanjanja 5'-vodećeg slijeda (Hopper, 2013.). Kod bakterija procesiranje 3'-kraja primarnog transkripta započinje endonukleaznim djelovanjem ribonukleaza E i III (Shepherd i Ibba, 2015.). Poput RNaze P ove dvije ribonukleaze nalaze se povezane s unutrašnjom stranom stanične membrane i poput RNaze P nisu specifične za jedan

određeni tip RNA molekula, već prepoznaju manje elemente primarne i sekundarne strukture. Tako RNaza E cijepa i prepoznaje jednolančanu RNA čiji je slijed bogat adeninom i uracilom, dok RNaza III kao svoj supstrat prepoznaje dvolančanu RNA (Mörl i Marchfelder, 2001.). Još je 1978. RNaza E identificirana kao enzim koji ima važnu ulogu u odvajanju pojedinih primarnih rRNA iz zajedničkog policistronskog transkripta (Shepherd i Ibba, 2015). Kasnije je uočeno kako nedostatak ovog enzima vodi nakupljanju primarnih transkripata za $tRNA^{Leu}$ i $tRNA^{His}$ koje se prepisuju neovisno o rRNA. Daljnje su analize ustvrdile kako su primarne uloge RNaze E cijepanje multimernih i policistronskih primarnih transkripata i procesiranje 3' pratećeg slijeda (Shepherd i Ibba, 2015.). RNaza III je homodimer koji je prvo opisan kao enzim nužan za procesiranje policistronskog transkripta 30S rRNA. Konačna potvrda stigla je otkrićem kako ovaj enzim u uvjetima *in vitro* izrezuje primarne transkripte za tRNA iz regije razmaknice (engl. *spacer*) primarnog transkripta 30S rRNA. Na mutantima *E. coli* koji nemaju funkcionalnu RNazu III ustvrđeno je kako ona ipak ima manju ulogu u ovom procesu. Tako sazrijevanje tRNA postaje ozbiljno ugroženo tek ukoliko je ujedno kompromitirano djelovanje RNaze E ili P koji očito imaju primarnu ulogu u endonukleaznom cijepanju primarnih transkripata bakterija (Shepherd i Ibba, 2015.). Nakon procesiranja 3'-kraja primarnog transkripta endonukleazama, obično zaostaje slijed koji nije dio zrele tRNA, a uklanjaju ga egzonukleaze. Šest različitih enzima (RNaza II, D, BN, T, PH i PNPaza) sposobno je katalizirati ovu reakciju *in vitro* i *in vivo* (Mörl i Marchfelder, 2001.). RNaza II je na početku istraživanja bila smatrana jedinim enzimom uključenim u 3'-egzonukleazno procesiranje primarnih transkripata. Kasnije je ustanovljeno kako se ovaj procesivni enzim ne može zaustaviti na slijedu CCA koji je kod bakterija, uglavnom, sadržan u transkriptu. Zbog važnosti ovog slijeda za normalno funkcioniranje zrele tRNA, njegovo oštećenje može biti pogubno. Daljnja potraga za specifičnijom egzonukleazom dovela je do otkrića RNaze D. Ovaj enzim je neprocesivan i uklanja sve dodatne ostatke na 3'-kraju dajući zrelu molekulu tRNA. Osim toga brzina hidrolitičke aktivnosti RNaze D trideset je puta manja na slijedu CCA što ga čini iznimno pogodnim za procesiranje 3'-kraja primarnog transkripta za tRNA (Shepherd i Ibba, 2015.). Slično eukariotima, neki primarni transkripti za tRNA bakterija nemaju genomom kodiran slijed CCA ili je on nepotpun. Takvi transkripti zahtijevaju procesiranje drugačijom egzonukleazom čija specifičnost za transkript nije određena prisutnošću intaktnog terminalnog slijeda CCA. Takvom bi opisu mogla odgovarati RNaza BN (Shepherd i Ibba, 2015.). Procesiranje 3'-kraja endonukleazama i egzonukleazama kod bakterija rezultira nastankom tRNA koja se potom podvrgava različitim modifikacijama nukleotida i u konačnici aminoacilaciji od strane aminoacil-tRNA-sintetaze.

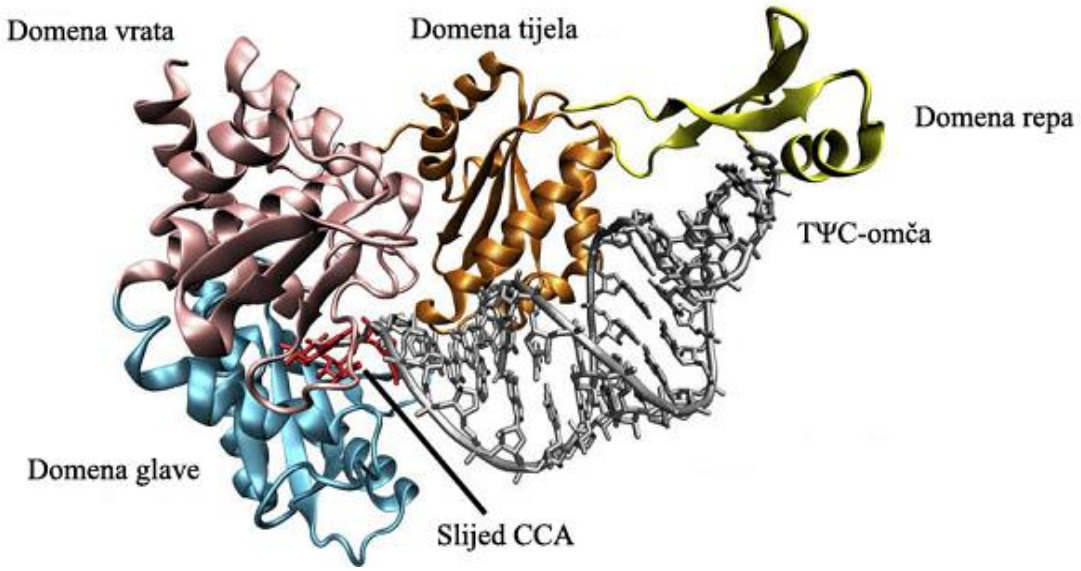
Iako je u uvjetima *in vitro* zapaženo djelovanje endonukleaza i egzonukleaza, većina eukariotskih puteva za procesiranje 3'-kraja ipak preferira odcjepljenje pratećeg slijeda endonukleazama. Spekulira se kako kod eukariota egzo- i endonukleaze imaju različitu mogućnost pristupa primarnom transkriptu (Mörl i Marchfelder, 2001.). Analize su ukazale na važnost proteina La (Lhp1) kao bitne komponente kompeticije između ova dva puta procesiranja. Naime, ukoliko je Lhp1 vezan na 3'-kraj primarnog transkripta Rex1 (egzonukleaza koja djeluje u smjeru od 3' prema 5') nije u mogućnosti procesirati primarni transkript pa se sazrijevanje 3' kraja odvija preko endonukleaznog puta djelovanjem RNaze Z (Trz1 kod kvasca). Na primjeru Trz1 enzima je pokazano kako on sudjeluje u sazrijevanju 3'-kraja transkripata za molekule tRNA koji su kodirani i jezgrenim i mitohondrijskim genomom (Hopper, 2013.). Ovi podaci upućuju kako, pod normalnim okolnostima u stanici, RNaza Z procesira 3'-kraj, a egzonukleazni put služi kao potpora u slučaju zastajkivanja endonukleaznog puta (Mörl i Marchfelder, 2001.). Osim kod kvasca, RNaza Z je primijećena i kod vinske mušice, ali i bakterije *Bacillus subtilis*. Većina RNaza Z cijepa primarni transkript odmah nakon baze na poziciji 73 (N_{73}) što prethodi adiciji karakterističnog slijeda CCA (Phizicky i Hopper, 2015.). Kako je otprije bilo poznato kako *B. subtilis* posjeduje i primarne transkripte za tRNA koji imaju slijed CCA kodiran genom, nametnulo se pitanje kako je ovaj slijed zaštićen od djelovanja RNaze Z. Tako je upravo kod ove bakterije primijećena čudesna karakteristika RNaze Z. Naime, K_M enzima za supstrate s terminalnim slijedom CCA je smanjen 2,5 puta, a V_{max} iznosi 0,4 % od one V_{max} u slučaju kada supstrat ima UAA sekvencu, s tim da najveći doprinos ovom efektu daje C na poziciji N_{74} (Phizicky i Hopper, 2015.). Dakle, RNaza Z ne cijepa zrele 3'-krajeve sa slijedom CCA. Ova karakteristika RNaze Z povlači za sobom činjenicu da u organizmima, s dvojnom prirodom primarnih transkripata tRNA, moraju postojati i enzimi koji mogu procesirati 3' krajeve s slijedom CCA koji je kodiran genom. Kod bakterije *B. subtilis* ovu funkciju vrše egzonukleaze RNaza PH i RNazi T slična ribonukleaza (Phizicky i Hopper, 2015.). Osim uloge u procesiranju 3'-kraja primarnih transkripata za tRNA, RNaza Z ima i neke dodatne uloge u stanici. Tako je RNaza Z iz arheje *Halferax volcanii* u uvjetima *in vitro* sposobna katalizirati procesiranje 5'-kraja 5S rRNA, dok je kod bakterije *E. coli* zabilježena uloga RNaze Z u obrtaju (engl. *turnover*) nekoliko molekula mRNA. Postojanje više supstrata u stanici moglo bi objasniti postojanje četiri homologa RNaze Z koji su pronađeni kod uročnjaka – zajednički za jezgru i mitohondrij, citopazmatski, isključivo mitohondrijski, te isključivo kloroplasni homolog (Phizicky i Hopper, 2015.).

U organelima eukariotskih stanica zabilježeno je procesiranje 3'-kraja primarnih transkripata endonukleazama koje uklanjaju prateći slijed cijepajući fosfatnu okosnicu na diskriminirajućoj poziciji 73. Ovakav oblik procesiranja zabilježen je kod mitohondrija kvasca, štakora i biljaka dok se kod kloroplasta mjesto cijepanja nalazi u neposrednoj blizini diskriminirajuće pozicije. Kod mitohondrija višestaničnih životinja uočeno je neobično procesiranje transkripta koji je prepisan s više gena. U ovom slučaju cijepanje rezultira intaktnom nizvodnom tRNA, dok uzvodnoj nedostaje nekoliko nukleotida koji se potom dodaju posttranskripcijski. Sve u svemu bitno je naglasiti kako procesiranje u organelima više nalikuje eukariotskom endonukleaznom procesiranju nego onom bakterijskom koji se odvija u više koraka. Ova činjenica sugerira kako su, kroz evoluciju, organeli izgubili originalne bakterijske, a stekli kopije enzima kodiranih genomom jezgre ili su pak razvili vlastite puteve procesiranja (Mörl i Marchfelder, 2001.).

4.2. Dodavanje slijeda CCA na 3'-kraj

Sve zrele molekule tRNA sadrže karakterističan slijed CCA na svom 3' kraju. Prisutnost ovog slijeda nužna je za aminoacilaciju tRNA od strane aminoacil-tRNA-sintetaze što je ključno za uspješnost translacije. Kod bakterije *E. coli*, kao i kod većine drugih bakterija, ovaj karakterističan slijed je kodiran u genu za tRNA. Ipak, pokazano je kako bakterije imaju eksprimiran enzim tRNA-nukleotidil-transferazu koji je sposoban dodavati terminalni slijed CCA. Pretpostavlja se kako ovaj enzim vjerojatno ima ulogu popravka ukoliko dođe do oštećenja slijeda prilikom uklanjanja pratećeg slijeda (Shepherd i Ibba, 2015.). Nasuprot bakterijama, kod eukariota se ovaj karakterističan slijed uvijek dodaje posttranskripcijski, enzimskom aktivnošću nukleotidil-transferaza. Nukleotidil-transferaza iz kvasca je kodirana genom *CCA1*, a prisutna je u više izoformi – Cca1-I, Cca1-II i Cca1-III. Izoforme nastaju zahvaljujući postojanju alternativnih transkripcijskih i translacijskih startnih mjesta. Jezgrin Cca1 sudjeluje u biogenezi zrelog 3'-kraja tRNA, citoplazmatski Cca1 sudjeluje u popravku dok mitohondrijski vjerojatno vrši obje funkcije (Hopper, 2013.). Arhejski enzim (Sl. 4) koji vrši funkciju dodavanja slijeda CCA ne pripada istom razredu superobitelji nukleotidil-transferaza kao bakterijski i eukariotski. Enzimi iz oba razreda imaju slične dimenzije i četiri domene nazvane glava, vrat, tijelo i rep, ali homologija primarnih sljedova izvan katalitičke srži ne postoji. Zanimljiva karakteristika ovih enzima, neovisno o razredu kojem pripadaju, je mogućnost dodavanja slijeda CCA na primarni transkript mehanizmom koji nije ovisan o kalupu. Istraživanje kristalne strukture ovog enzima iz arheje *Archaeoglobus fulgidus* pokazalo je kako je razlikovanje citozin- i adenozin-trifosfata, koji u pojedinim koracima služe kao

supstrati, omogućeno promjenom veličine i oblika džepa enzima koji ih veže. Ove promjene džepa uzrokovane su elongacijom 3'-kraja molekule tRNA. Enzim ove arheje je homodimer čiji svaki monomer sudjeluje u formiranju sve četiri domene. Domene vrata i glave formiraju katalitičku udubinu u koju se smješta 3'-kraj molekule tRNA dok domena repa veže TΨC-omču kako bi se osigurala precizna polimerizacija i kasnija terminacija reakcije. Pretpostavlja se kako ovaj enzim ima i lektorirajuću ulogu kojom provjerava slijed nakon ugradnje dva nukleotida (Heinemann i sur., 2010).



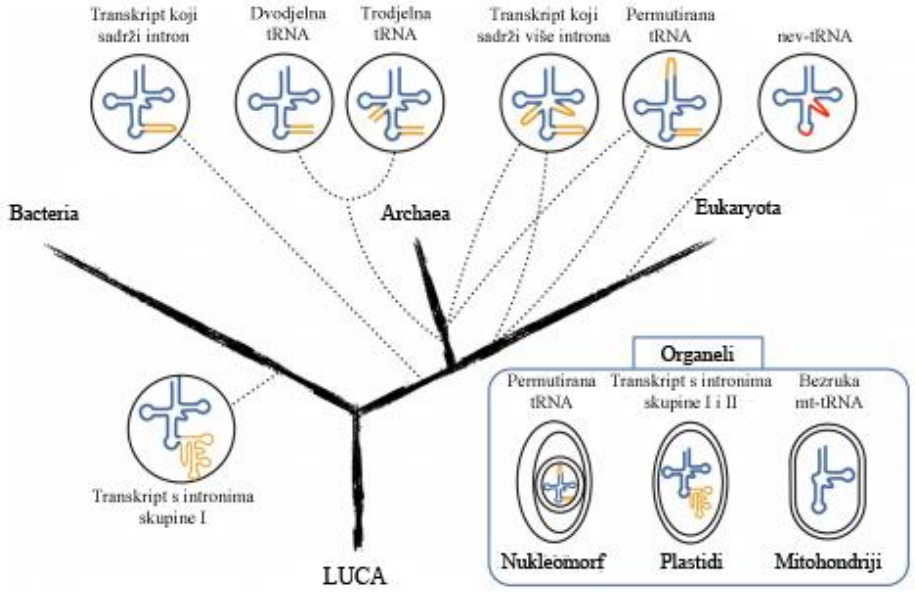
Slika 4. Kristalna struktura enzima, koji dodaje terminalni slijed CCA na 3' kraj primarnih transkripata za tRNA arheje *Archaeoglobus fulgidus*, u kompleksu s minizavojnicom kao supstratom. Različitim bojama su naznačene četiri domene ovog enzima. Preuzeto i preuređeno prema Heinemann i sur., 2010.

5. IZREZIVANJE INTRONA

5.1. Raznolikost gena za tRNA u odnosu na sadržaj introna

Prekrajanje primarnih transkripata za tRNA je, kao sastavni segment procesiranja, prisutan u sve tri domene živog svijeta (Sl. 5): bakterija, arheja, eukarioti (Fujishima i Kanai, 2014.). Introni primarnih transkripata za tRNA eukariota i arheja pripadaju skupini IV introna (Cox i Nelson, 2013.). Takve introne uz utrošak molekule ATP-a izrezuju proteinske endonukleaze. Nasuprot njima, transkripti za tRNA bakterija i organela sadrže različite samoizrezujuće introne skupine I ili II (Hopper i sur., 2010.). Ove samoizrezujuće, katalitičke RNA imaju dvojaku katalitičku aktivnost. Radi se, dakako, o endonukleaznoj i ligaznoj aktivnosti. Tako se ova vrsta introna može samostalno izrezati iz primarnog transkripta uz

združivanje uzvodnog i nizvodnog segmenata u zrelu tRNA molekulu (Heinemann i sur., 2010.). Prisustvo samoizrezujućih introna skupine I potvrđeno je kod cijanobakterija i nekolicine α- i β-proteobakterija. Kod cijanobakterija su trenutno poznata dva introna skupine I. Prvi se nalazi u primarnom transkriptu za $tRNA^{fMet}$. Za njega se smatra da je usvojen relativno nedavno horizontalnim prijenosom gena. Drugi intron se nalazi u transkriptu za $tRNA^{Leu}$ i prisutan je i kod plastida eukariotskih stanica (Sl. 5) pa se smatra da je, po podrijetlu, dosta stariji od prvog. Glavnina bakterijskih i plastidnih samoizrezujućih introna smještena je tik nizvodno od antikodonskog tripleta, a sastoje se od stotinjak nukleotida. Njihova se struktura



Slika 5. Raznolikost gena za tRNA u tri domene života uključujući i različite organele eukariotskih stanica. Istočkane linije povezuju vrstu gena za tRNA s domenama u kojima je do sad uočen. Intronski i sljedovi razmaknice (engl. *spacer*) označeni su narančasto dok crvena boja označuje regije koje odstupaju od standardne tRNA. Preuzeto iz Fujishima i Kanai, 2014.

sastoji od 10 uzvojnica koje čine katalitičku srž izrezivanja (Fujishima i Kanai, 2014.).

Sličnu lokalizaciju pokazuju i introni kvasca i kralježnjaka. Nasuprot njima introni arheja pokazuju mnogo veću raznolikost u pozicioniranju unutar primarnog transkripta. Primijećena je i filogenetička raznolikost glede postotka gena za tRNA koji sadrže introne. Tako, primjerice, neke bakterije poput *E. coli* uopće nemaju tRNA transkripte s intronima, dok se spomenuti postotak kod ljudi, vinske mušice, miša i *Caenorhabditis elegans* kreće oko 5 %. Kod kvasca je uočeno kako 20 % transkripata za tRNA sadrži introne, a kod nekih se arheja (Thermoproteales) ovaj postotak kreće oko 70 % (Hopper, 2013.). Arhejski transkripti su po svom intronskom sastavu najraznolikiji. Njihovi introni su dugački između 16 i 44 nukleotida,

a mogu se nalaziti na različitim pozicijama u transkriptu, čak ih može biti i više unutar jednog primarnog transkripta za tRNA (Sl. 6). Većina otkrivenih gena za tRNA s dva i svi geni s tri introna pronađeni su kod spomenute skupine Thermoproteales. Važno je naglasiti kako ovi introni pokazuju neobičan stupanj očuvanosti unutar skupine. Primjerice, identični introni su uočeni na 22/23 i 43/44 pozicijama $tRNA^{Asn}$ (GTT) i $tRNA^{Ile}$ (GAT) kod arheje *Thermofilium pendens* te na poziciji 53/54 $tRNA^{Pro}$ (TGG) i $tRNA^{Ala}$ (TGC) kod *Pyrobaculum calidifontis*. Arheajski introni zauzimaju konformaciju u obliku BHB-motiva (od engl. *buldge-helix-buldge*). Motiv se sastoji od dva trinukleotidna ispupčenja i jedne zavojnice od četiri nukleotida koja je nalazi između njih (Heinemann i sur., 2010.). Raznolikost arhejskih gena za molekule tRNA ide i korak dalje. Tako su zabilježeni i neobični dvodjelni (engl. *split*) i trodjelni (engl. *tri-split*) primarni transkripti za tRNA, a kod arheja i jednostaničnih algi neobična permutirana tRNA (Fujishima i Kanai, 2014.). O ovim neuobičajenim transkriptima bit će više riječi u nastavku rada.

5.2. Prekrajanje primarnih transkripata za tRNA kod eukariota

Zajedno s arhejskim, eukariotske endonukleaze, koje prekrajaju primarne transkripte za tRNA, spadaju u EndA obitelj enzima čiji pripadnici pokazuju veliku raznolikost. Uočene sličnosti i razlike unutar skupine upućuju na moguće događaje koji su se događali tijekom evolucije EndA (Fujishima i Kanai, 2014). Kao i većina drugih oblika procesiranja primarnih transkripata, prekrajanje primarnog transkripta za tRNA je najbolje proučeno kod kvasca *S. cerevisiae*. Tako je otkriveno da se kod kvasca ovo prekrajanje odvija u tri koraka.

Prvi korak je uklanjanje introna koje katalizira heterotetramerna (Sen2, Sen34, Sen15 i Sen54) endonukleaza za prekrajanje primarnog transkripta za tRNA (Hopper i sur., 2010.). Podjedinice Sen2 i Sen34 evolucijski su očuvane od arheja do čovjeka unatoč tomu što arhejska EndA prepoznaje spomenuti motiv BHB, a eukariotska ne (Hopper, 2013.; Hopper i sur., 2010.). Katalitička srž enzima, koja se sastoji od 50 aminokiselina, evolucijski je također je dobro očuvana. Visok stupanj očuvanosti srži upućuje na monofiletsko podrijetlo enzima iz obitelji EndA (Fujishima i Kanai, 2014.). Druge dvije podjedinice, Sen15 i Sen54, ne pokazuju evolucijsku očuvanost od kvasca do čovjeka (Hopper, 2013.). Promatranjem termosenzitivnih mutanata, ustanovljeno je kako su Sen2 i Sen34 katalitičke podjedinice endonukleaze za prekrajanje i kako su redom odgovorne za cijepanje na 5'- i 3'-kraju introna. Uloga drugih dviju podjedinica nije u potpunosti razjašnjena, no pretpostavlja se da sudjeluju u pozicioniranju mjesta cijepanja na transkriptu (Hopper, 2013.). Prvi korak reakcije prekrajanja primarnog

transkripta rezultira nastankom 5'-eksona tRNA s 2'-3' cikličkim fosfatom i 3' eksona s 5' hidroksilnom skupinom (Hopper i sur., 2010.). Drugi korak prekrajanja je reakcija spajanja 5' i 3' eksona koju kod kvasca katalizira ligaza Trl1. Trl1 ima kompleksan mehanizam djelovanja u kojem do izražaja dolaze njezine četiri katalitičke aktivnosti. Trl1 prvo djeluje kao fofodiesteraza razgrađujući 2'-3' ciklički fosfat, potom kao kinaza, koristeći GTP, foforilira 3' kraj eksona. Treća aktivnost je adenilacija 5'-fosfata koristeći ATP kao donora skupine. Konačna, četvrta aktivnost Trl1 je ligazna kojom enzim spaja dva eksona. Ovaj korak rezultira oslobađanjem AMP-a dok na 2' kisiku zadnjeg nukleotida bivšeg 5'-eksona zaostaje fosfat (Hopper, 2013.). Ovaj fosfat uklanja se u trećem i finalnom koraku prekrajanja, a njegovo uklanjanje katalizira 2'-fosfo-transferaza (Tpt1). Tpt1 uklonjeni fosfat prenosi na NAD^+ tvoreći novi metabolički intermedijer adenozin-difosfat-ribozu 1"-2" ciklički fosfat (Hopper i sur., 2010.; Hopper, 2013.).

Drugi korak prekrajanja – ligacija nije u potpunosti očuvan među eukariotima. Biljke tako koriste jednak put kao i kvasac, no kralježnjaci, slično arhejama, koriste direktnu 3'-5' ligaciju. Proteinski kompleks kralježnjaka, koji katalizira drugi korak prekrajanja, katalizira spajanje fosfata iz 2'-, 3'- cikličke veze s 5'-hidroksilnom skupinom 3'-eksona (Hopper, 2013.). Korištenjem ovakvog mehanizma gubi se potreba za trećim korakom prekrajanja koji je prisutan kod kvasca jer nema zaostalog fosfata kojeg bi bilo potrebno ukloniti. Zanimljivo je, kako je kod sisavaca zabilježena prisutnost ligaze koja je slična kvaščevoj kao i postojanje puta prekrajanja koje se odvija u tri koraka. Od prije je bilo poznato kako kod kvasca Trl1 katalizira i ligaciju koja slijedi nakon izrezivanja introna s *HAC1* mRNA s endonukleazom Ire1. Ovo prekrajanje je nužan element odgovora na pogrešno smotane proteine. Ovakva uloga ligaze je potvrđena i kod čovjeka, no nije zabilježena kod miša (Phizicky i Hopper, 2016.).

Kod kralježnjaka se prekrajanje primarnog transkripta za tRNA odvija u jezgri dok kod kvasca to nije slučaj. Kvaščeva endonukleaza za prekrajanje je lokalizirana na površini mitohondrija, ligaza u citoplazmi, a 2'-fosfotransferaza u citoplazmi i jezgri (Hopper, 2013.). Lokalizacija prekrajanja primarnog transkripta kod biljaka nije potpuno razjašnjena. Endonukleaza je pronađena u jezgri, u citoplazmi, ali i asocirana na kloroplastima dok se biljna ligaza nalazi u citoplazmi te asocirana s koloroplastima i mitohondrijima (Hopper i sur., 2010.).

5.3. *Prekrajanje primarnih transkripata za tRNA kod arheja*

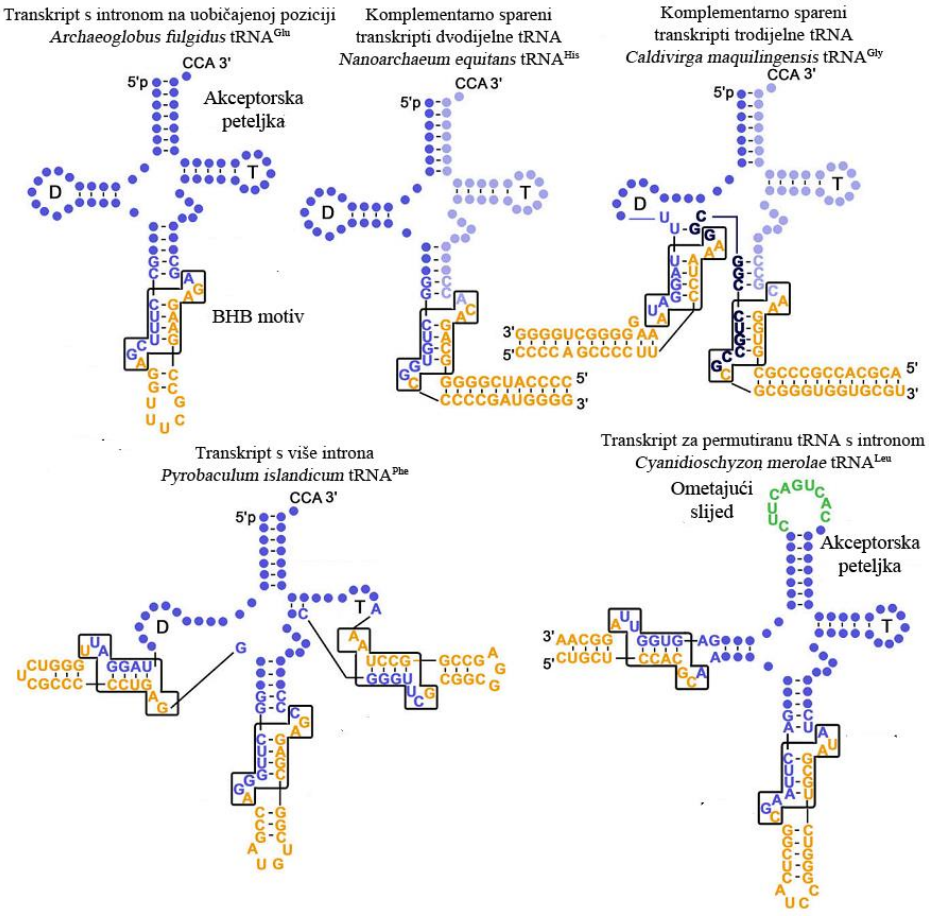
Postoje četiri poznata tipa arhejskih endonukleaza za prekrajanje primarnih transkripata za tRNA. Homotetramerni α_4 tip i homodimerni α_2 skupine Euryarchaeota su jedini koji su sposobni za izrezivanje kanonskih introna koji tvore BHB-motiv. Heterotetramerni $(\alpha\beta)_2$ je, uglavnom, zastupljen kod skupine Crenarchaeota uz iznimke: *N. equitans* (Nanoarchaeota), *Methanopyrus kandleri* (Euryarchaeota) (Fujishima i Kanai, 2014.).

Ova tri tipa endonukleaza za prekrajanje imaju sličnu kvarternu strukturu na kojoj se raspoznaju četiri domene s tim da je podjedinica homodimera gotovo dvostruko veća od podjedinice tetramernog enzima. Četiri domene enzima oblikuju dva aktivna mjesta razmaknuta 27 Å što odgovara udaljenosti između dva mjesta cijepanja fosfatne okosnice supstrata u obliku motiva BHB. Endonukleaze za prekrajanje sadrže tri konzervirana aminokiselinska ostatka koji čine katalitičku trijadu – tirozin, histidin, lizin. Katalizirana reakcija rezultira nastankom 2',3'-cikličkog fosfata na jednom i 5'-hidroksilne skupine na drugom produktu. Tirozin potiče deprotonaciju 2'-nukleofilnog kisika supstrata, dok histidin, u svojoj uobičajenoj ulozi, donira proton izlazećoj 5'-skupini (Heinemann i sur., 2010.). Četvrti tip (homodimer ε_2) otkriven je 2011. godine. Svaka ε podjedinica sastavljena je od tri domene, a enzim služi za prekrajanje primarnog transkripta koji na različitim pozicijama sadrži nekanonske introne (Fujishima i Kanai, 2014.).

5.4. *Dvodjelne i trodjelne tRNA*

Prva dvodjelna tRNA (engl. *split tRNA*) zapažena je kod parazitske arheje *N. equitans* (Sl. 6). Činjenica da se sastavljaju iz dva transkripta, glavna je karakteristika dvodijelnih tRNA molekula. Međusobno sparivanje različitih transkripata može biti jako zanimljivo, tako je 3'-polovica molekule $tRNA^{Glu}$ jedinstvena po tome što se može spariti s bilo kojom od dvije 5'-polovice molekule $tRNA^{Glu}$ (Fujishima i Kanai, 2014.). Analiza je pokazala kako je put, kojim iz polovičnih molekula nastaje funkcionalna tRNA, sličan putu procesiranja introna. Naime, svaka 3'-polovična molekula sadrži u svom transkriptu vodeći slijed koji je komplementaran slijedu 5'-polovičnog transkripta koji se nalazi nizvodno od slijeda za konačnu 5'-polovicu molekule tRNA. Sparivanje ovih sljedova rezultira nastankom dvostruke zavojnice RNA, dužine 14 nukleotida, što potiče daljnje sparivanje samih polovica molekule tRNA (Heinemann i sur., 2010.). Strukturna analiza konformacije, nastale sparivanjem dodatnih slijedova, potvrdila je prisutnost motiva BHB što ukazuje na očitu poveznicu s putom procesiranja introna. Nadalje, ustanovljeno je kako je razdjeljak, uglavnom, pozicioniran između baza na pozicijama

37 i 38 što se poklapa s uobičajenim položajem introna. Kod arheje *N. equitans* je ustanovljeno kako njezina heterotetramerna endonukleaza, koja obavlja prekrajanje transkripata, može ukloniti motiv nastao sparivanjem komplementarnih sljedova polovičnih transkripata. Produkti navedene reakcije, potom, mogu biti spareni djelovanjem ligaze čime nastane zrela tRNA (Heinemann i sur., 2010.). U početku je smatrano kako je dvodijelna tRNA specifičnost parazitske *N. equitans*, no 2009. godine prisutnost dvodijelnih tRNA je potvrđena i kod slobodnoživuće arheje *Caldivirga maquilingensis* (Fujishima i sur., 2009.). Osim dvodijelnih kod ove arheje su po prvi put zabilježene i trodijelne tRNA. Neki od transkripata koji sadrže antikodon mogu se, po principu slagalice, sparivati s različitim transkriptima koji nose ostale regije dajući tako sinonimne molekule tRNA (Fujishima i Kanai, 2014.). Spomenuto je kako prisutnost motiva BHB i lokalizacija nakon sparivanja polovica upućuju na povezanost pratećih i vodećih sljedova polovičnih transkripata s intronima. Dodatna potvrda povezanosti stigla je i



Slika 6. Raznolikost arhejskih primarnih transkripata za tRNA. Arhejski tip endonukleaze za prekrajanje introna prepoznaje motiv BHB (naznačen na slici) i odvaja disruptivne sljedove (narančasto) od tRNA eksona (plavo). Različite nijanse plave ukazuju na slaganje tRNA od dva ili tri različita transkripta, dok je zeleno označen ometajući (engl. *intervening*) slijed permutirane tRNA koji se vjerojatno uklanja djelovanjem RNaze P i RNaze Z. Preuzeto iz Heinemann i sur., 2010.

otkrićem i sličnosti u sljedovima (Heinemann i sur., 2010.). Tako primjerice, kod *Pyrobaculum islandicum* vodeći sljedovi dvaju izoakceptorskih 3'-polovičnih transkripata za $tRNA^{Ala}_{CGC/TGC}$ dijele 90% aminokiselinskog slijeda s intronom iz transkripta za $tRNA^{Ala}_{TGC}$ (Fujishima i Kanai, 2014.).

5.5. Permutirana tRNA

Permutirana tRNA je još jedna vrsta nekanonske tRNA. Otkrivena je 2007. godine kod jednostanične crvene alge *Cyanidioschyzon merolae* (Sl. 6). Njezina neuobičajenost je u tome što joj je unutar gena s kojeg se prepisuje kod za 3'-polovicu smješten uzvodno od koda za 5'-polovicu (Fujishima i Kanai, 2014.) zbog čega je i nazvana permutirana. Kao i kod kanonske u transkriptu postoje sljedovi koje je potrebno ukloniti kako bi nastala zrela, funkcionalna tRNA molekula. Vodeći i prateći slijed transkripta međusobno su komplemetarni, a njihovo sparivanje rezultira nastankom motiva BHB unutar D-omče buduće molekule tRNA. Ovaj motiv je supstrat kojeg prepoznaje opisana endonukleazu, koja prekraja i kanonske transkripte, a potom za ligazu koja spaja krajeve što rezultira nastankom kužne molekule. Zaostali ometajući (engl. *intervening*) slijed najvjerojatnije izrezuju RNaza P ili RNaza Z (Heinemann i sur., 2010.) kako bi nastala zrela, funkcionalna akceptorska peteljka sa slobodnim 5'- i 3'-krajevima. U šest od deset poznatih gena za permutirane tRNA kod *C. merolae* vodeći i prateći sljedovi pozicionirani su tik nizvodno od antikodona što upućuje na povezanost s intronima. Na Sl. 6 prikazan je primarni transkript za $tRNA^{Leu}_{UAA}$ transkript koji osim terminalnog motiva BHB u D-omči sadrži i intron nakon antikodonske sekvence. Zanimljivo kako je i ovdje zapaženo svojevrsno odstupanja pa tako kod dvaju transkripata prekrajanje koje rezultira nastankom kružne molekule tRNA se odvija unutar TΨC-omče (Heinemann i sur., 2010.). Osim kod *C. merolae* permutirane tRNA kasnije su pronađene i u nukleomorfu jednostanične zelene alge *Bigelowiella natans* (Fujishima i Kanai, 2014.), a 2011. godine je po prvi puta uočena kod predstavnika arheja, *Thermofilum pendens* (Chan i sur., 2011.). Ovo otkriće moglo bi biti još jedan dokaz hipoteze koja pretpostavlja kako su eukarioti proizišli iz arhejske linije (Fujishima i Kanai, 2014).

6. MODIFIKACIJE NUKLEOTIDA

Prilikom izvršavanja svojih uloga u stanici molekule tRNA moraju stupati u specifične interakcije s različitim proteinima poput aminoacil-tRNA-sintetaza, elongacijskih faktora,

proteinima koji ih distribuiraju po stanici i sl. Osim ovih interakcija, tRNA moraju biti i u mogućnosti precizno prepoznati kodon s molekule mRNA čime je osigurana točnost translacije. Zbog ovih zahtjeva molekule tRNA moraju, u jednu ruku, biti dovoljno slične kako bi sudjelovale u istim putevima, a u drugu dovoljno različite da zadrže svoju specifičnost. Naime, kako bi interagirale s ribosomom i translacijskim faktorima različite molekule tRNA moraju biti strukturno slične i posjedovati zajedničke elemente koji omogućuju prepoznavanje bitno za normalno sudjelovanje u translaciji (Hopper, 2013.). Nasuprot tomu, među različitim vrstama molekula tRNA mora postojati strukturna raznolikost kako bi mogle prepoznavati različite kodone i kako bi stupale u interakciju samo sa sebi specifičnim aminoacil-tRNA sintetazama. U odnosu na proteine, koji imaju dvadesetak osnovnih sastavnih elemenata - aminokiselina, molekule tRNA imaju malen broj osnovnih sastavnih elemenata (četiri ribonukleotida). Malen broj osnovnih sastavnih elemenata ograničava mogućnost postizanja visoke kemijske raznolikosti koja je prijeko potrebna za normalno funkcioniranje u stanici. Kako bi se postigla veća kemijska raznolikost molekule tRNA podliježu nizu posttranskripcijskih modifikacija (El Yacoubi i sur., 2012.). Posttranskripcijske modifikacije jedne su od najzanimljivijih karakteristika molekula tRNA, a većina njihovih uloga su još uvijek predmet istraživanja (Hopper, 2013.). Do danas je poznato stotinjak različitih modifikacija nukleotida molekula tRNA u svim domenama života (Phizicky i Hopper, 2010.). Informacije o strukturi, poziciji, ali i biosintetskim putevima i enzimima koji u njima sudjeluju, objedinjene su u bazama podataka koje su dostupne za pregled putem mreže. Uglavnom, se spominju tri baze: *RNA modification database* (http://mods.rna.albany.edu/), *Modomics* (http://modomics.genesilico.pl/), *tRNAdb* (http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de/). Uloge modifikacija tRNA molekula desetljećima su bile nerazjašnjene, no kombinacija genetičkih, biokemijskih i bioinformatičkih istraživanja omogućila je bolje upoznavanje s proteomom koji stoji iza katalize posttranskripcijskih modifikacija (Hopper 2013.). Ova su istraživanja bacila svjetlo i na uloge pojedinih modifikacija i njihovo značenje za funkcionalnost molekule tRNA u stanici (Yacoubi i sur., 2012.).

6.1. Uloge posttranskripcijskih modifikacija ribonukleotida

Danas poznate uloge posttranskripcijskih modifikacija molekule tRNA uključuju vjernost translacije, u okviru točnosti prepoznavanja kodon-antikodon i očuvanja otvorenog okvira čitanja, diskriminaciju različitih molekula tRNA te strukturnu stabilnost molekule tRNA (Hopper, 2013.). Modifikacije uključene u točnost translacije na razini prepoznavanja kodon-antikodon ili očuvanja otvorenog okvira čitanja nalaze se unutar antikodonske omče. Kao što

se može i pretpostaviti na temelju modifikacije koje su zaslužne za ispravno prepoznavanje kodona nalaze se unutar samog antikodona (34-36) (Hopper, 2013.). Dobro proučen primjer ovakve modifikacije je deaminacija adenozina (A) u inozin (I) na poziciji 34 koji potom sudjeluje u *wobble* sparivanju i pridonosi degeneraciji genetičkog koda (Cox i Nelson, 2013.). O ovoj modifikaciji i njezinoj učestalosti u različitim domenama života bit će više riječi u nastavku teksta. Drugi primjer je 2-lizidin (k^2C, Sl. 7) na istoj poziciji. Ova modifikacija omogućuje molekuli $tRNA^{Ile}$ bakterije *E. coli* diskriminaciju kodona za izoleucin (AUA) od onog za metionin (AUG). Sličnu ulogu imaju i druge modifikacije na poziciji 34 poput 2′-O-metilcitidina (C_m) i kveuozina (Q) kod redom $tRNA^{Trp}$ i $tRNA^{Tyr}$. One omogućuju uspješnu diskriminaciju kodona za tirozin i triptofan od STOP kodona (Shepherd i Ibba, 2015.). Može se primijetiti kako nedostatak ovih modifikacija može dovesti do supresije besmislenih mutacija zbog čega se često koristi u različitim istraživanjima. Modifikacije na pozicijama unutar antikodonske omče, ali ne u samom antikodonu, uglavnom, su odgovorne za očuvanje otvorenog okvira čitanja. Tako primjerice, nedostatak vibutozina (yW, Sl. 7) na poziciji 37 molekule $tRNA^{Phe}$ rezultira pomakom okvira čitanja od -1 (Hopper, 2013.). Isto vrijedi i za 5-metil-2-tiouridin (m^5s^2U) i 2-metiltio-N^6-izopenteniladenozin (ms^2i^6A, Sl. 7). Naime, ovim modifikacijama često podliježu baze na poziciji 37 čime se sprječava mogućnost njezinog sparivanja s bazom na poziciji 36. Ovakvo sparivanje dovelo bi do pomaka okvira čitanja koje može biti pogubno za stanicu. U sve tri domene točnost translacije kodona molekulama tRNA, čiji antikodon započinje adeninom (A_{34}), osigurana je modifikacijom N^6-treonilkarbamoiladenozin (t^6A_{37}, Sl. 7). Slično, molekule tRNA čiji antikodoni započinju s citozinom ili gvaninom imaju m^1G_{37} modifikaciju (Shepherd i Ibba, 2015.). Ove modifikacije, uglavnom, su esencijalne, a mutanti bakterija ili kvasaca kod kojih one nedostaju uopće nisu vijabilni ili imaju jako smanjenu brzinu rasta (Phizicky i Hopper, 2010.).

Druga važna uloga modifikacija je osiguravanje diskriminacije među različitim vrstama molekula tRNA. Jedan od najboljih primjera je razlikovanje $tRNA_i^{Met}$ od $tRNA_e^{Met}$ od strane inicijacijskog (eIF2) i elongacijskog (eEF1α) faktora u procesu translacije. Ključno otkriće za razrješavanje mehanizma diskriminacije stiglo je pronalaskom gena *rit1*. Produkt ovog gena, protein Rit1, ostvaruje interakcije samo s TΨC-rukom molekule $tRNA_i^{Met}$. Po vezanju katalizira ribozilaciju A_{64} u 2′-O-riboziladenozine fosfat (Ar(p), Sl. 7). Tako modificiranu molekulu tRNA eEF1α više ne može prepoznati kao svoj supstrat (Hopper, 2013.). Za vjernost translacije bitno je i prepoznavanje točne molekule tRNA od strane aminoacil-tRNA-sintetaze jer se samo na razini ove interakcije osigurava ispravna uparenost antikodona i specifične aminokiseline

(Cox i Nelson, 2013). U ovom prepoznavanju modifikacije mogu igrati ključnu ulogu. Poznato je kako 1-metilgvanozin (m^1G_{37}) sprječava pogrešnu acilaciju $tRNA^{Asp}$ od strane ArgRS kod kvasca, dok je kod bakterije *E. coli* uočeno kako lizidin na poziciji 34 sprječava pogrešnu acilaciju $tRNA^{Ile}$ metioninom (Phizicky i Hopper, 2010.).

Modifikacije nukleotida su često glavni faktori koji omogućuju intramolekularno sparivanje baza koje na razini sekundarne i tercijarne strukture omogućuje stabilnost molekule tRNA. Kroz očuvanje strukture takve modifikacije indirektno sudjeluju i u pravilnom funkcioniranju molekule tRNA na kojoj se nalaze. Najpoznatiji primjer je održavanje karakterističnog L-oblika tRNA molekule interakcijom dihidrouridina (D, Sl. 7) iz D-omče i modifikacija poput timidina, 5-metiluridina ili pseudouridina (Ψ, Sl. 7) iz TΨC-omče. Uz to poznato je i kako metilacije baza destabiliziraju Watson-Crickovo sparivanje što rezultira velikim strukturnim promjenama na razini cijele molekule tRNA (Yacoubi i sur., 2012.).

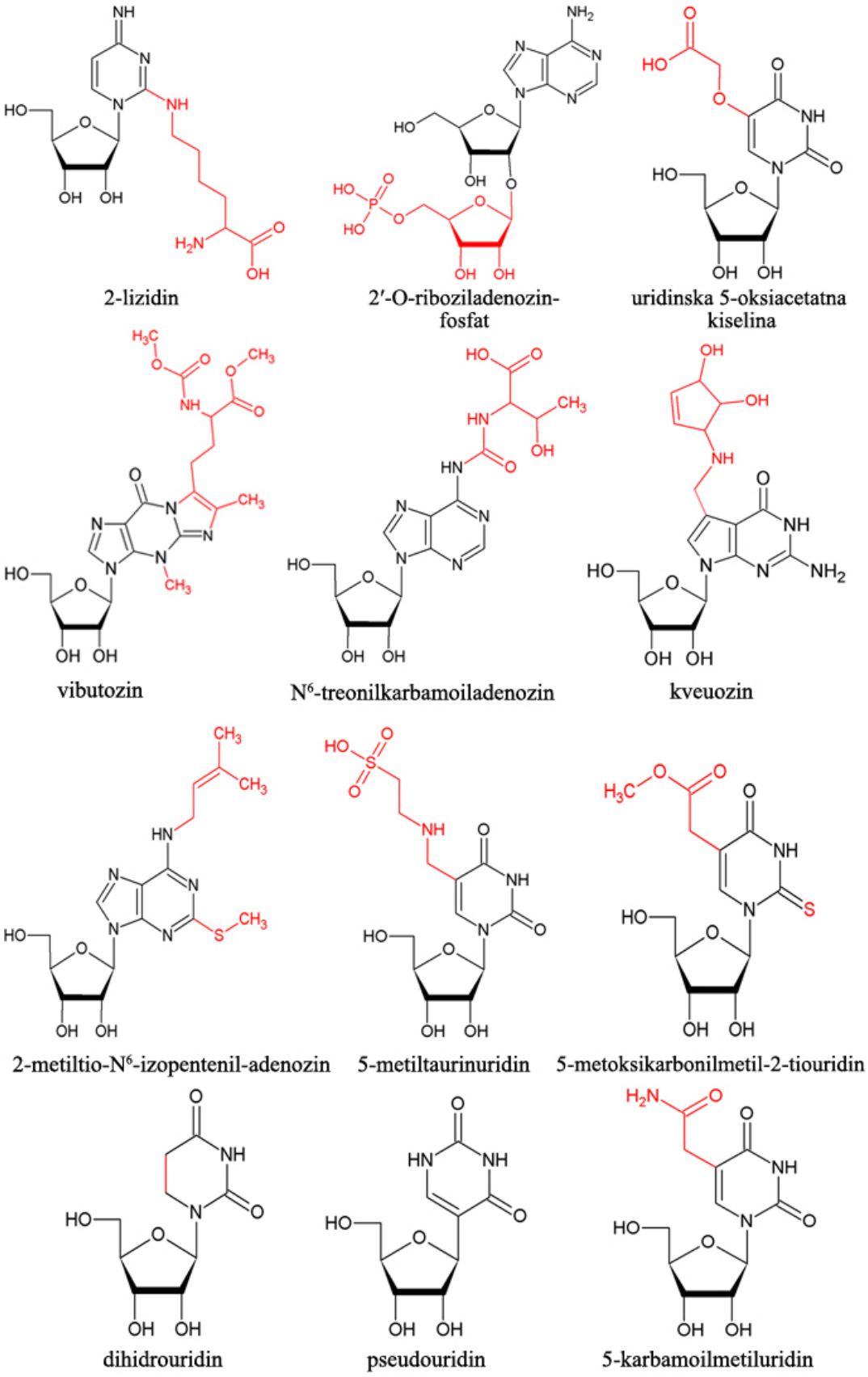
Modifikacije mogu osigurati stabilnost tRNA molekula na povišenim temperaturama. Neke od poznatih modifikacija koje su ključne za takvu stabilnost su m^1A_{58} u $tRNA_i^{Met}$ kvasca i T_{54} kod $tRNA^{fMet}$ *E.coli*. Nedostatak potonjeg dokazano rezultira snižavanjem temperature mekšanja (Tm) (Phizicky i Hopper, 2010.). U termalnoj stabilizaciji sudjeluju i N^4-acetil-2′-O-metilcitidin (ac^4C_m), 1,2′-O-dimetilinozin (m^1I_m), 2′-O-metilgvanozin (G_m) i N^2,N^2,2′-O-trimetilgvanozin ($m^2{}_2G_m$) koji su iznimno važni za hipertermofile (Yacoubi i sur., 2012.) te 5-metil-2-tiouridin (m^5s^2U) termofilnih gram-negativnih bakterija koja stabilizira trodimenzionalnu strukturu na visokim temperaturama (Machnicka i sur., 2014.). Nedostatak m^1A_9 kod čovjeka rezultira nastankom alternativne strukture dok nedostatak Ψ rezultira destabilizacijom uzvojnica (Phizicky i Hopper, 2010.). Za stabilnost strukture molekule tRNA od iznimne je važnosti i interakcija s magnezijevim ionima (Mg^{2+}). Poznat primjer modifikacije važne za ovu interakciju je m^5C (Yacoubi i sur., 2012.).

Glavne uloge modifikacija svakako su očuvanje strukture te učinkovitosti i vjernosti translacije, ali smatra se kako one također posjeduju globalnu, regulacijsku ulogu koja služi kao poveznica između sinteze proteina, metabolizma i odgovora na stresne uvjete (Phizicky i Hopper, 2010.). Oksidacijski ili toplinski stres mogu rezultirati promjenama u modifikacijama ribonukleotida molekule tRNA što u nastavku dovodi do reprogramiranja translacije. Tako, primjerice, prilikom oksidacijskog stresa, porast koncentracije vodikova peroksida potiče enzim Trm4 kvasca na uvođenje m^5C modifikacije na poziciji 34 $tRNA^{Leu}_{CAA}$ koja omogućuje povišenu translaciju UUG kodona čime mijenja učestalost njegova korištenja (engl. *codon*

usage) u stanici. Sinteza proteina tada je reprogramirana u smjeru povišenja nivoa translacije proteina koji sadrže ovaj kodon, a često su takvi proteini dio staničnog odgovora na ovaj tip stresa (Hopper, 2010.). Nadalje, što se tiče uloge modifikacija u odgovoru na toplinski stres, kod nekih termofilnih bakterija koje su rasle na višoj temperaturi zabilježen je porast broja modifikacija koje doprinose povišenju Tm vrijednosti (El Yacoubi et al., 2012). Time se molekule tRNA štite od denaturacije koja bi uzrokovala gubitak njihove funkcionalnosti.

6.2. Pozicija, učestalost i očuvanost posttranskripcijskih modifikacija ribonukleotida unutar molekule tRNA

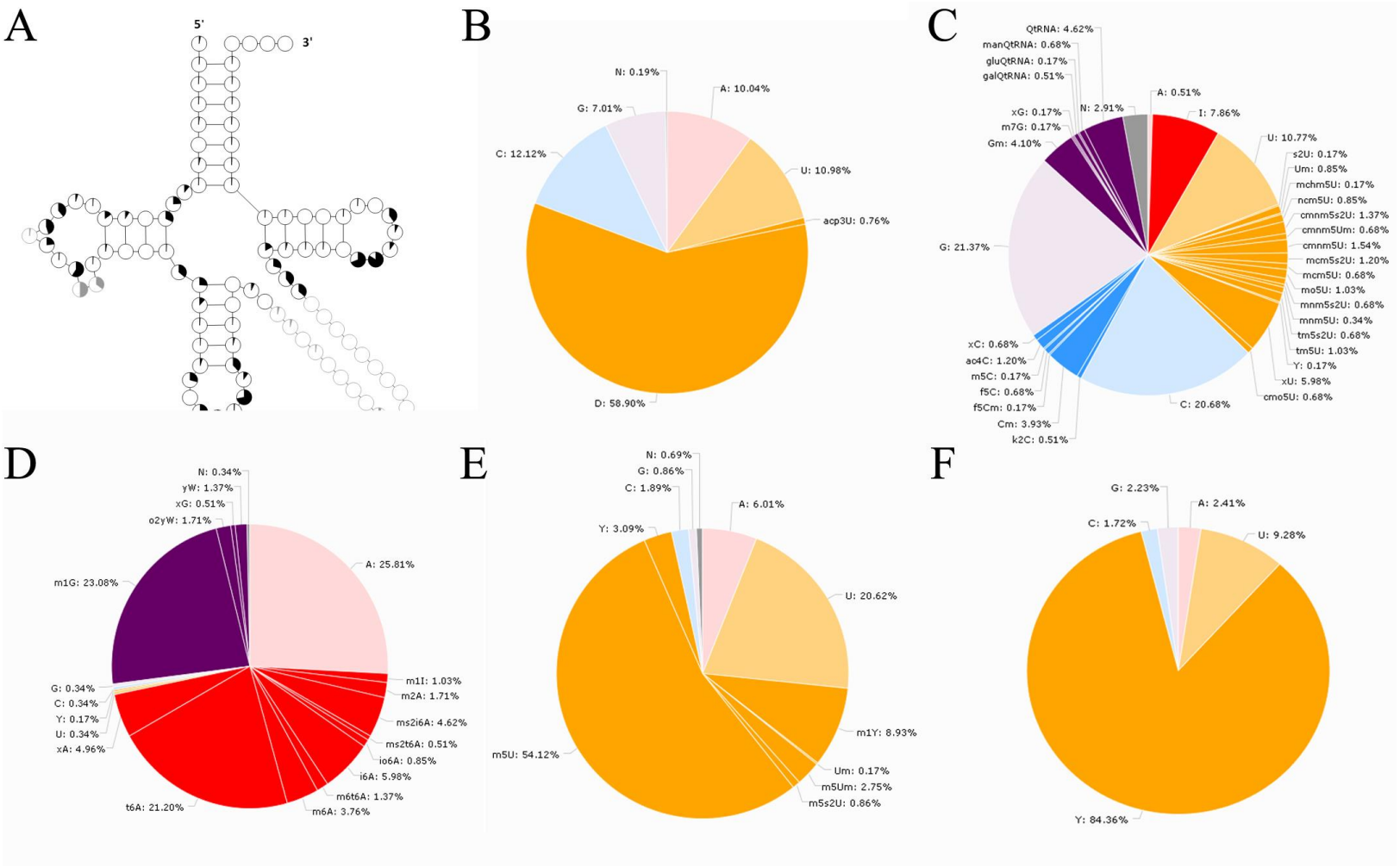
U prethodnom se poglavlju moglo primijetiti kako su neke pozicije (primjerice 34 i 37) unutar molekule tRNA češće modificirane u odnosu na druge, bilo da je riječ o istim ili različitim oblicima modifikacija. Iz ovoga je proizišla podjela modifikacija prema očuvanosti identiteta i pozicije. Prema ovoj su podjeli modifikacije na određenim pozicijama svrstane u tri grupe. Prvu grupu čine oni modificirani oblici nukleotida koji imaju očuvanu i poziciju i identitet. Ove modifikacije, uglavnom, uvode evolucijski očuvani modifikacijski enzimi. Najbolje poznati primjeri modifikacija koje spadaju u ovu skupinu su dihidrouridin (D) i 2'-O-metilgvanozin (G_m) iz D-omče te 5-metiluridin (m^5U) i pseudouridin (Ψ) iz TΨC-omče. Druga kategorija su modificirani ribonukleotidni ostatci koji imaju očuvanu poziciju unutar molekule tRNA, no ne i identitet. Tako su primjerice već spomenuti ostatci na pozicijama 34 i 37 unutar antikodonske omče često različito hipermodificirani. Enzimi koji uvode modifikacije ove kategorije nisu nužno očuvani što upućuje na njihovu funkcionalnu konvergenciju. Modificirani ostaci koji pripadaju trećoj grupi vrlo su raznoliki po svom identitetu i poziciji i specifični su za pojedine vrste molekula tRNA. Uglavnom se radi o jednostavnim kemijskim alternacijama poput metilacije baze i riboze ili izomernim derivatima poput pseudouridina. U skladu s očekivanim, modifikacijski enzimi ove skupine su jako raznovrsni i vrsno specifični (Machanicka i sur., 2014.). Sl. 8 prikazuje distribuciju modifikacija unutar molekule tRNA (Sl. 8A) te zastupljenost pojedinih modifikacija na pozicijama koje često podliježu različitim modifikacijama bitnima za funkcioniranje molekule tRNA (Sl. 8B-F). Grafovi prikazani na slici su rezultat analize 582 poznatih sljedova molekula tRNA iz triju domena (Archaea, Bacteria, Eukaryota). Sljedovi su preuzeti iz baze podataka *Modomics* dok je sama analiza provedena alatom *tRNAmodoviz* (http://genesilico.pl/trnamodviz/jit_viz/select_tRNA/). Iz analize se može zamijetiti kako su neke pozicije modificirane u visokom postotku poznatih sljedova (npr. 37, 54, 55 i dr.). Ovdje se, uglavnom, radi o modifikacijama bitnima za funkcioniranje i očuvanje strukturne stabilnosti.



Slika 7. Modifikacije ribonukleotida molekule tRNA. Na slici su prikazane strukture samo nekih od stotinjak do sada poznatih modifikacija. Preuzeto i prilagođeno s http://modomics.genesilico.pl/modifications/

Možemo zaključiti kako nisu sve modifikacije jednako dobro očuvane. Od svih modifikacija najbolje je očuvan Ψ_{55} unutar TΨC-omče. Ovu modifikaciju ne posjeduju tRNA molekule mitohondrija, mikoplazmi i nekolicina citoplazmatskih $tRNA_i$. Druga po svojoj očuvanosti je modifikacija pozicije 54 u obliku m^5U i njegovih derivata poput 5-metil-2-tiouridina (m^5s^2U) termofilnih bakterija i 5,2'-O-dimetiluridin (m^5U_m) (Machanicka i sur., 2014.). Dobro je očuvan i već spomenuti dihidrouridin na pozicijama 20, 20a ili 20b unutar D-omče. O ulozi dijela ovih modifikacija u očuvanju strukture molekule tRNA, već je bilo riječi u prethodnom poglavlju. U drugu kategoriju modifikacija uvrštene su modifikacije na pozicijama 34 i 37 koje su modificirane u velikom broju poznatih molekula tRNA, ali se te modifikacije razlikuju od vrste do vrste molekule tRNA. Iz rezultata spomenute analize (Sl. C-D) se može primijetiti širok spektar mogućih modifikacija ovih pozicija koji je nešto uži za poziciju 37. Raznolikost u modificiranju 34 je očekivana jer se radi o poziciji unutar antikodona koji je specifičnost svake vrste molekule tRNA. Uloga modifikacija na ovim pozicijama u translaciji već je opisana u prethodnom poglavlju.

Postoji više karakteristika koje razlikuju prokariotske molekule tRNA od eukariotskih. Tako prokariotske tRNA, uglavnom, nemaju modifikacija unutar akceptorske peteljke i varijabilne regije. S druge strane, postoje i modifikacije karakteristične upravo za prokariote. Najpoznatiji primjeri su 4-tiouridin (s^4U) unutar poveznice D-ruke s akceptorskom peteljkom, zatim 5-metoksiuridin (mo^5U) i uridinska 5-oksiacetatna kiselina (cmo^5U, Sl. 7) na poziciji 34 (Machanicka i sur., 2014.). Bitno je napomenuti kako postoje brojne razlike između arheja i bakterija u pogledu modifikacija pojedinih podjedinica. Isto se odnosi i na niže kategorije ovih dviju domena. Tako je zabilježeno da Gram-pozitivne bakterije imaju najmanji stupanj modifikacija molekula tRNA koje, uglavnom, sadrže samo evolucijski jako očuvane modifikacije. Jedina poznata modifikacija koja je karakteristična za Gram-pozitivne bakterije je 1-metiladenin (m^1A) na poziciji 22. Naspram Gram-pozitivnih, Gram-negativne bilježe nešto veću učestalost modifikacija, a za termofilne vrste karakteristična je, već spomenuta, modifikacija m^5s^2U na poziciji 54. Za razliku od ostalih domena, bakterije nemaju 5-metilcitozin na 5' kraju TΨC-ruke. Ova modifikacija prisutna je kod svih eukariota i jedne skupine arheja (Euryarchaeota) ukazujući na moguću evolucijsku povezanost ovih skupina. Ista skupina arheja sadrži i karakteristični 1-metilpseudouridin ($m^1\Psi$) na poziciji 54 koja je kod drugih skupina, uglavnom, rezervirana za m^5U i njegove derivate. Karakteristika Euryarchaeota je i 2'-O-metilcitozin (C_m) na poziciji 56 i 1-metilinozin (m^1I) na poziciji 57 (Machanicka i sur., 2014.).



Slika 8. A) Učestalost prisutnosti modificiranog nukleotida na pojedinim pozicijama unutar molekule tRNA dobivena analizom 585 sljedova molekula tRNA iz tri domene života. Vrste modifikacija i njihova učestalost na pozicijama (B) 20, (C) 34, (D) 37, (E) 54, (F) 55. Grafovi su dobiveni korištenjem *tRNAmodoviz* alata. Preuzeto s http://genesilico.pl/trnamodviz/jit_viz/select_tRNA/.

Glavne modifikacije karakteristične za eukariote su N^4-acetilcitidin (ac^4C) na poziciji 12 te pseudouridin na poziciji 27 uočen kod jednostaničnih organizama, gljiva i višestaničnih životinja. Usporedba sljedova pomoću spomenutog alata *tRNAmodoviz* (Machanicka i sur., 2014.) ukazala je i na manji broj modifikacija kod tRNA plastida u odnosu na citoplazmatske što se posebice odnosi na područje akceptorke petlje. Pokazana je prisutnost samo najbolje očuvanih modifikacija poput m^5U_{54} i Ψ_{55}, dok im s druge strane nedostaju acp^3U unutar D-omče i 2'-O-metiluridin (U_m) koji su prisutni u svim ostalim vrstama eukariotskih tRNA. Kod plastida je primijećen i nedostatak m^1A_{58} koji je inače očuvana u svim domenama života. Nasuprot plastidnim mitohondrijske tRNA bilježe najveći broj neočuvanih modifikacija, poput ostataka na prvoj poziciji antikodona koji sadrži taurin, dok im s druge strane također nedostaju najočuvanije poput Ψ_{55}. Ovom fenomenu pridonosi i reduciranost u strukturi mitohondrijskih molekula tRNA o kojoj je već bilo riječi (Machanicka i sur., 2014.). U distribuciji modifikacija svakako se mogu tražiti potvrde endosimbiotske teorije i evolucijskih puteva pojedinih skupina.

6.3. Putevi biosinteze modifikacija

Putevi nastanka modifikacija različite su kompleksnosti koja, uglavnom, korelira s kompleksnošću same modifikacije. Tako, primjerice, nastanak $mcm^5s^2U_{34}$ modifikacije citoplazmatskih molekula tRNA kod kvasca zahtijeva sudjelovanje preko 20 proteina (Yacoubi i sur., 2012.). Kao što je već spomenuto napredak tehnika i alata omogućio je razjašnjavanje velikog broja biosintetskih puteva modifikacija molekula tRNA pa su do danas razjašnjeni i neki od najkompleksnijih puteva poput nastanka vibutozina i ostalih derivata izoviozina (imG) (Yacoubi i sur., 2012.). Svi podaci prikupljeni iscrpnim istraživanjem puteva biosinteze modifikacija nukleotida molekule tRNA objedinjeni su u već spomenutim bazama podataka i dostupni su putem interneta. Ovaj rad nudi pregled samo nekolicine dobro poznatih puteva biosinteze modifikacija nukleotida molekule tRNA.

Metilacija RNA:metiltransferazama

Metilacija je vrlo zastupljen oblik modikacije nukleotida molekule tRNA. Enzimi koji uvode ovaj tip modifikacija, RNA:metiltransferaze, uključeni su u širok spektar biosintetskih puteva modifikacija, bilo da su jedini enzim u putu ili tek jedan u nizu enzima čije zajedničko djelovanje rezultira nastankom neke od kompleksnijih modifikacija. RNA:metiltransferaze spadaju u veliku skupinu staničnih enzima – metiltransferaza, koje, kao što im i samo ime kaže, prenose metilnu skupinu na različite supstrate. Postoji pet različitih klasa metiltransferaza, a većina DNA:MTaza i RNA:MTaza pripada klasi I ili IV. Enzimi koji pripadaju ovim klasama

kao donora metilne skupine gotovo uvijek koriste S-adenozil-L-metionin (AdoMet), a RNA:MTaze ovisne o njemu posjeduju dobro očuvan proteinski motiv pomoću kojeg ga mogu vezati. Reakcije se, uglavnom, odvijaju putem SN_2 mehanizma koji podrazumijeva nukleofilni napad s RNA supstrata na elektrofilnu metilnu grupu AdoMet-a. Konačni produkti reakcije su metilirani RNA supstrat i S-adenozil-L-homocistein (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). Kod bakterija su pronađene metiltransferaze koje modificiraju nukleotide pomoću drugačije vrste mehanizma. Naime, radi se o se o enzimima RmlN i Cfr koji uvode modifikacije koristeći radikalnu AdoMet metilaciju (Stojkovic i Fujimori, 2015.). Ovi enzimi modificiraju 23rRNA molekulu, no pretpostavlja se da bi u stanici mogli postojati slični enzimi koji prenose metilnu skupinu na nukleotide molekule tRNA (Hori, 2014.). Još jedna potvrda ove hipoteze je postojanje metiltiotransferaza (MiaB obitelj proteina) koje koriste sličan mehanizam, s tim da prenose tiometilnu skupinu, a uključene su u formiranje ms^2t^6A, ms^2i^6A i derivata vibutozina molekula tRNA (Hori, 2014).

Ovisno o atomu na kojeg se prenosi metilna skupina katalizirana reakcija može rezultirati N-metilacijom, O-metilacijom ili C-metilacijom. Zbog njihove nukleofilnosti, prilikom metilacije dušika ili kisika dolazi do direktnog prijenosa metilne skupine. S druge pak strane, elektrofilni karakter ugljikova atoma sprječava direktan prijenos metilne skupine prilikom C-metilacije (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). U ovakvim slučajevima razvijene su posebne strategije na osnovu kojih su MTaze koje metiliraju ugljik razvrstane u četiri skupine (A-D) od kojih tri (A,B i C) kao donora metilne skupine koriste AdoMet. Donor metilne skupine u slučaju skupine D je 5, 10 – metilentetrahidrofolat (Hori, 2014.). Detaljan pregledni rad o ovoj skupini enzima objavljen je 2015. godine (Bauerle i sur., 2015.). Pojedini tRNA modifikacijski enzimi koji provode N-metilaciju dobro su izučeni. Neki od njih su Trm5, koji metilira N^1gvanina, i ErmC' koji metilira N^6 adenina (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). Radi se o dvije vrlo česte modifikacije molekula tRNA. Trm5 sudjeluje u spomenutoj biosintezi vibutozina gdje u jednom od koraka biosinteze provodi spomenutu metilaciju. Od kisikovih atoma često se metilira kisik koji je vezan na 2'-ugljikov atom riboze (TrmH). Ova modifikacija je važna za stabilnost strukture molekule tRNA jer pogoduje 3'-endo konformaciji riboze (Phizicky i Hopper, 2010.). Kod enzima koji provode ovakav tip modifikacije zabilježeno je prisustvo više katalitičkih strategija koje mogu uključivati različite metalne kofaktore poput Mg^{2+} ili Mn^{2+} (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). Metilacija ugljikova atoma između ostalog rezultira nastankom m^5U i njegovih derivata na poziciji 34 te m^5U na poziciji 54. Potonja modifikacija je prisutna kod gotovo svih bakterija uz iznimku bakterije *Mycoplasma*

capricolum. Kod bakterije *E. coli* je pokazano da ovu modifikaciju uvodi TrmA koji koristi mehanizam ovisan o kofaktoru AdoMet. Znanstvenici su bezuspješno tragali za njegovim homologom kod drugih organizama čije tRNA molekule posjeduju ovu modifikaciju. Kasnije je kod bakterije *B. subtilis* otkriven flavoprotein TrmFO koji nije srodan proteinu TrmA, a uvodi spomenutu modifikaciju preko mehanizma u kojem je donor metilne skupine 5, 10 – metilentetrahidrofolat (El Yacoubi i sur., 2012.).

Derivati m^5U_{34}

5-aminometiluridin (nm^5U) je derivat modifikacije m^5U zastupljen na poziciji 34 određenih molekula tRNA bakterija i mitohondrija. Kod eukariota je na ovoj poziciji zastupljen 5-karboksimetiluridin (cm^5U, Sl. 7). Kompleks MnmE-GidA sudjeluje u formiranju nm^5U bakterija, ukoliko ugradi amonijak, ili $cmnm^5U$ ukoliko ugradi glicin. Pretpostavlja se da je put sinteze u mitohondriju sličan bakterijskom uz mogućnost ugradnje taurina kod sisavaca što rezultira τm^5U (Sl. 7) umjesto glicina (El Yacoubi i sur., 2012.).

Kompleks Elp, otkriven kod kvasca, sudjeluje u kompleksnom biosintetskom putu 5-metoksikarboniluridin (cm^5U) u kojem sudjeluje više od 20 polipeptida i nije u potpunosti razjašnjen (El Yacoubi i sur., 2012.). Prije otkrića njegove uloge u modificiranju transkripta za tRNA kompleks Elp je često bio pročišćen zajedno s hiperfosforliliranom Pol II (aktivna u elongaciji). Osim toga bilo je poznato kako sudjeluje u acetilaciji H3 i H4 histona i regulaciji egzocitoze kroz interakcije sa Sec2. Elp se sastoji od šest podjedinica organiziranih u dva podkompleksa Elp1-3 i Elp4-6, a uz to pridruženi su mu i Kti11 te Kti12. Poznato je i kako inaktivacija bilo koje podjedinice ili pridruženih proteina vodi nedostatku mcm^5U, 5-metoksikarbonilmetil-2-tiouridin (mcm^5s^2U, Sl. 7) ili 5-karbamoilmetiluridin (ncm^5U) modifikacije na poziciji 34. Dokazano je da u metilaciji cm^5U do mcm^5U sudjeluje kompleks Trm9/Trm112 dok pri uvođenju modifikacije mcm^5s^2U sudjeluje i protein NCS2 koji provodi tiolaciju. Važnost ovih modifikacija je prije svega u očuvanju vjernosti translacije. Tako mcm^5s^2U, uglavnom, omogućuje pravilno prepoznavanje adenina (i gvanina u slučaju $tRNA^{Gln}_{UUG}$), dok ostale dvije omogućuju prepoznavanje gvanina iz kodona. Zanimljivo je da nedostatak ovih modifikacija vodi ka otpornosti na γ-toksin bakterije *Kluyveromyces lactis* čije se štetno djelovanje svodi na cijepanje molekule tRNA na mjestu spomenutih modifikacija. Mutacija ortologa Elp1 kod ljudi se povezuje s razvojem obiteljske disautomnije, nasljedne neurodegenerativne bolesti. Kod oblića *C. elegans* mutacija istog ortologa (ili ortologa Elp3) uzrokuje razvojne defekte (Phizicky i Hopper, 2010.).

Biosinteza modifikacija koje zahtijevaju tiolaciju

Najznačajnije modifikacije koje zahtijevaju tiolaciju su s^2U, s^4U i s^2C te ms^2A i njezini derivati. Enzimi koji kataliziraju prijenos tiolne skupine nazivaju se sulfotransferaze (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). Najbolje proučen član ove enzimske skupine je Thi1 koji je odgovoran za formiranje s^4U_8. Thi1 katalizira prijenos atoma sumpora s donora na bazu uridina preko stvaranja persulfidnog intermedijera. Donor sumpora kod bakterija je enzim piridoksal-5'-fosfat-ovisna-cistidin-desulfuraza dok je kod metanogenih arheja kao donor sumpora prihvatljiv i sam sulfid (Yacoubi i sur., 2012.). Nastanak s^4U_8 primjer je direktnog prijenosa sumpora s donora na enzim (Thi1) koji ga potom predaje uridinu. Za razliku od ovog puta u biosintezi s^2U_{34}, koja je dobro opisana kod bakterije *E. coli*, sumpor prvo prelazi preko kaskade TusA/TusBCD/TusE da bi se prenio na MnmA koji provodi samu tiolaciju uracila (Phizicky i Hopper, 2010.).

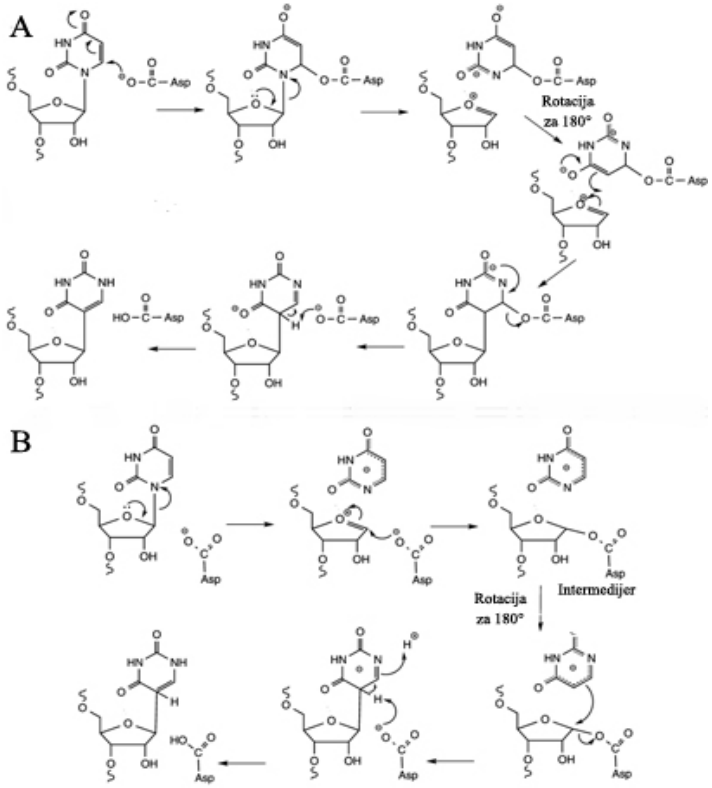
Modifikacije tRNA-gvanin-transglikozilazama

Reakcija koju katalizira tRNA-gvanin-transglikozilaza (TGT) u kratkim crtama se svodi na zamjenu gvanina nekim od njegovih deaza derivata. Jedan od takvih derivata je prekveuozin ($preQ_1$) koji, nakon inkorporacije na mjesto gvanina, podilazi daljnjim modifikacijama do nastanka kveuozina ili nekog od njegovih derivata. Za razliku od bakterija eukariotski enzim preferira direktnu ugradnju kveuozina (Yacoubi i sur., 2012.). Mehanizam TGT temelji se na cijepanju N-glikozilne veze između gvanina i riboze uslijed nukleofilnog napada kisika iz karboksilne skupine aspartata. Napad rezultira oslobađanjem gvanina i nastankom kovalentnog intermedijera između enzima i RNA supstrata. U drugom se koraku, na mjesto oslobođenog gvanina, inkorporira nova baza (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). Q modifikacija česta je na poziciji kolebljive baze kod molekula tRNA s antikodonima GUN, a njezin prekursor koji se ugrađuje na mjesto gvanina može se pribaviti *de novo* sintezom iz GTP-a ili spašavanjem iz molekularnog otpada. Mogućnost provođenja *de novo* sinteze kveuozina dokazana je samo kod bakterija, a ostali ga organizmi primaju ishranom (El Yacoubi i sur., 2012.).

Sinteza pseudouridina

Pseudouridin je najzastupljenija modifikacija staničnih molekula RNA zbog čega se često naziva petim nukleotidom molekula RNA. Uz nekoliko iznimku opažen je kod većine tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA i ostalih RNA molekula. Njegovo je podrijetlo posttranskirpcijsko, a uvode ga enzimi RNA:Ψ-sintetaze koje se prema očuvanosti slijeda i strukture dijele u 6 različitih obitelji (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). Među enzimima iz različitih obitelji očuvan je samo katalitički aspartat (Asp) kojem su, kod nekih enzima,

pridruženi i bazični lizinski ili argininski aminokiselinski ostatak (Ramamurthy i sur., 1999.). Razlike među enzimima idu u prilog razlikovanju mnoštva supstrata, u vidu različitih vrsta molekula RNA koje podliježu modifikaciji (tRNA, rRNA, snRNA…). Unatoč razlikama sve reakcije katalizirane RNA:Ψ-sintetazama rezultiraju nastankom pseudouridina. Mehanizam RNA:Ψ-sintetaza počiva na nukleofilnom svojstvu katalitičkog aspartata i lomu N-glikozidne veze između uracila i riboze te nastankom intermedijera koji je kovalentno vezan na Asp. Mehanizam nalikuje onom kod TGT uz ključnu razliku. Naime, prilikom ove katalize ne dolazi do inkorporacije nove baze. Nakon loma slijedi rotacija uracila, koji zaostaje unutar aktivnog mjesta, a potom i ponovno spajanje uracila i riboze putem C-C veze. Unatoč iscrpnom istraživanju sinteze pseudouridina, točan mehanizam same izomerizacije još nije ustanovljen. Kao moguća rješenja, predložena su dva modela (Sl. 9). U prvom modelu deprotonirani kisik karboksilne skupina aspartata (Asp) napada C^6 uracila. Potom slijedi pucanje glikozidne veze i oslobađanje uracila s riboze. Uracil koji je u tom trenutku vezan s Asp se rotira nakon čega se formira nova C-C veza između uracila i riboze, a Asp je izlazeća skupina (Boschi-Muller i Motorin, 2013.). Najznačajnija razlika u drugom modelu je nukleofilni napad karboksilnog kisika na C^1 riboze koji rezultira kovalentnim povezivanjem riboze i Asp. Uracil se, u tom slučaju, oslobađa kao anion koji se rotira u aktivnom mjestu, nakon čega napada C^1 riboze (Sl. 9B).



Slika 9. Predloženi mehanizmi izomerizacije prilikom sinteze pseudouridina u RNA molekulu. Preuzeto i preuređeno prema Boschi-Muller i Motorin, 2013.

Biosinteza univerzalne modifikacije N^6-treonilkarbamoiladenozin (t^6A)

N^6-treonilkarbamoiladenozin (t^6A) na poziciji 37 je jedna od rijetkih modifikacija koje se mogu naći u sve tri domene života. Deutsch i sur. su 2012. godine *in vitro* rekonstruirali biosintetski put ove modifikacije kojeg koristi bakterija *E. coli*. U biosintezi sudjeluju četiri enzima od kojih su TsaC i TsaD redom članovi evolucijski očuvanih obitelji YrdC/Sua5 i YgjD/Kae1/Qri7. Naspram njima, TsaE i TsaB su članovi obitelji YjeE i YeaZ koje su specifične za bakterije. Homolozi ovih obitelji nedostaju kod eukariota i arheja (Yacoubi i sur., 2012.). Ovim, dvjema skupinama dovoljna su dva proteina Sua5 i Kae1. Potonji protein je kod eukariota, kao dio kompleksa KEOPS, uključen u različite procese poput homeostaze telomera, remodeliranje kromatina, transkripcije i dr. Qri7 je mitohondrijski homolog proteina TsaD i jedini je poznati mitohondrijski predstavnik ovog puta (Yacoubi i sur., 2012.).

Modifikacija adenozina u inozin

Deaminacija adenina zastupljenija je kod eukariota nego kod prokariota. Jedina poznata prokariotska vrsta molekule tRNA s ovom modifikacijom na poziciji 34 je $tRNA^{Arg}_{ACG}$ bakterija i kloroplasta. Enzim TadA (*tRNA-specific adenosine deaminase*), koji provodi deaminaciju A_{34}, otkriven je kod bakterije *E. coli.* Za prepoznavanje ciljne molekule tRNA od strane ovog enzima dovoljna je antikodonska petlja koja pri stvaranju interakcija s enzimom prolazi kroz drastičnu promjenu konformacije. Pokazano je kako se specifične interakcije ostvaruju između TadA i slijeda nukleotida između 33. i 36. pozicije. Nadalje, kod nekolicine arhejskih molekula tRNA A_{57} je modificiran u N^1-metilinozin s metilacijom koja prethodi deaminaciji. Eukariotske tRNA prolaze kroz deaminaciju A_{34} i A_{37} koje provode različiti enzimi. Deaminaciju na poziciji 34 (čak sedam vrsta molekula tRNA kod kvasca) provodi heterodimerni enzim ADAT2/ADAT3 (*adenosine deaminase acting on tRNA*) dok onu na poziciji 37 provodi ADAT1 (Su i Randau, 2011.).

Modifikacija citidina u uridin

Većina poznatih deaminacija citozina u uracil, u okviru modifikacija molekula tRNA, odvija se u organelima eukariotskih stanica. Modifikacije zastupljene u akceptorskoj petlji uglavnom su važne za prepoznavanje transkripta od strane RNaza P i Z dok one u antikodonskoj omči osiguravaju ispravnost translacije. Deaminacija C_{32} u U_{32} citoplazmatske $tRNA^{Thr}_{AGU}$, jednostaničnog uzročnika bolesti spavanja – *Trypanossoma brucei*, stimulira deaminaciju A_{34} bitnu za održavanje kolebljive baze (Su i Randau, 2011.). Zanimljiva uloga ove modifikacije otkrivena je kod hipertermofilne arheje. Naime, kod većine tRNA uridin na poziciji 8 kodiran je genom i igra važnu ulogu u održavanju tercijarne strukture molekule sparujući se po

Hoogsteenu s A_{14}. Godine 2009. otkriveno je da geni za 30 vrsta molekula tRNA hipertermohilne arheje *Methanopyrus kanderi* umjesto za U_8 kodiraju za C_8. Činjenica je začudila znanstvenike koji su uglavnom pretpostavljali kako je spomenuta Hoogsteen interakcija manje važna za strukturu molekula tRNA ove arheje. Kasnije je otkriven enzim CDAT8 (engl. *cytidine deaminase acting on tRNA base* C_8) koji katalizira deaminaciju C_8 nakon prepoznavanja 3'-kraja i akceptorske peteljke molekule tRNA koju modificira. Kako se ne nalazi u zreloj molekuli tRNA, postavlja se pitanje zašto je ova mutacija u genu ponudila selektivnu prednost. Neka od mogućih objašnjenja su sprječavanje preuranjene tiolacije, stabilizacija transkripta kroz prethodne korake procesiranja ili pak zaštita gena od ugradnje virusa. Poznato je kako se virusi ugrađuju u evolucijski očuvane sljedove pa bi mutacija očuvanog uracila i prisutnost enzima CDAT8 pružile značajnu selekcijsku prednost (Su i Randau, 2011.).

Formiranje vibutozina

Vibutozin (yW, Sl. 7) i njegov derivat, peroksivibutozin, kompleksne su gvanozinske modifikacije, uglavnom, prisutne na poziciji 37 $tRNA^{Phe}$ većine eukariota. Njima slični derivati gvanozina zabilježeni kod arhejskih $tRNA^{Phe}$ (Phizicky i Hopper, 2010.). Neobičnu strukturu vibutozina karakterizira fuzija gvaninskog s dodatnom imidazolskim prstenom koji nosi α-amino-α-karboksi-propilnu skupinu metionina. Poticaj za istraživanje biosinteze ove modifikacije, koja je danas razjašnjena na primjeru kvasca, svakako je bilo opaženo sniženje razine njezina uvođenja kod različitih tumorskih stanica (Phizicky i Hopper, 2010.). Biosintetski put ove modifikacije započinje već spomenutom metilacijom gvanina koju vrši MTaza Trm5, nakon čega slijedi formiranje metil-imidazolnog prstena (Tyw1), adicija α-amio-α-karboksi-propilne skupine metionina (Tyw2) i metilacija N^3 pozicije (Tyw3). Posljednji korak uključuje metilaciju α-karboksilne skupine, metoksikarboksilaciju α-amio skupine pri kojoj se ugrađuje ugljikov dioksid. Sve ove reakcije katalizira enzim Tyw4 (Phizicky i Hopper, 2010.). U daljnje modifikacije koje rezultiraju nastankom derivata na poziciji 37 često su uključene metiltiotransferaze koje se koriste mehanizmom koji uključuje nastanak AdoMet radikala (Hori, 2014.).

7. PROCESIRANJE PRIMARNOG TRANSKRIPTA ZA tRNA I LJUDSKE BOLESTI

Promjene u procesiranju primarnog transkripta za tRNA mogu pridonijeti pojavi ljudskih bolesti na dva različita načina. Prvi je vrlo intuitivan. Naime, kako je pravilno procesiranje važan preduvjet funkcionalnosti molekula tRNA nije začuđujuće da pogreške u ovim procesima kod ljudi mogu voditi nastanku bolesti. Osim toga, promjene u procesiranju mogu i indirektno uzrokovati razvoj ljudskih bolesti. Promjene u procesiranju transkripata za tRNA patogena mogu doprinijeti njihovoj infektivnosti što za posljedicu ima razvoj bolesti kod zaražene osobe. U ovom poglavlju ponuđen je kratak pregled nekih od do sada poznatih primjera koji odgovaraju jednom od dva spomenuta aspekta utjecaja procesiranja na ispoljavanje bolesti kod ljudi.

Pogreške u procesiranju tRNA kod ljudi, uglavnom, se javljaju zbog mutacija enzima koji kataliziraju pojedine korake procesiranja. Tako, primjerice, mutacije enzima uključenih u prekrajanje introna uzrokuje neurodegenerativnu pontocerebralnu hiperplaziju. Prekrajanje introna transkripta za tRNA ima vrlo važnu ulogu u centralnom živčanom sustavu u odnosu na ostale organske sustave stoga ne začuđuje da se simptomi očituju upravo u njemu. Za ovu bolest karakteristične su smetnje u rastu i razvoju te funkcioniranju moždanog debla i malog mozga (Abbott i sur., 2014.). Nadalje, pronađena je veza između nepravilnog funkcioniranja modifikacijskih enzima i dijabetesa, tumora, neurodegenerativnih i bolesti povezanih s metabolizmom. Potonje su, uglavnom, rezultat pogreški u modifikaciji molekula tRNA mitohondrija u kojem se odvijaju procesi važni za dobivanje energije u obliku molekula ATP (Hori, 2014.).

Neke modifikacije koje se nalaze u zrelim molekulama tRNA nužne su za infektivnost patogena. Tako su enzimi Tgt (uvodi Q_{34}) i TruB (uvodi Ψ_{55}) esencijalni za infektivnost organizama *Shigella flexneri* i *Pseudomonas aeruginosa*. Slično je za infektivnost gljivice *Colletotrichum lagenarium* esencijalna metiltransferaza koja uvodi modifikaciju m^7G_{46}. Kod enterobakterija crijevne mikroflore je pokazano kako modifikacija G_m na poziciji 18 sprječava imunostimulaciju pri čemu modifikacija djeluje kao antagonist receptora TLR7odgovornog za poticanje imunosnog odgovora. Zbog načina djelovanja molekula tRNA s ovom modifikacijom bi se mogla iskoristiti u razvoju protuupalnih lijekova (Hori, 2014.).

.

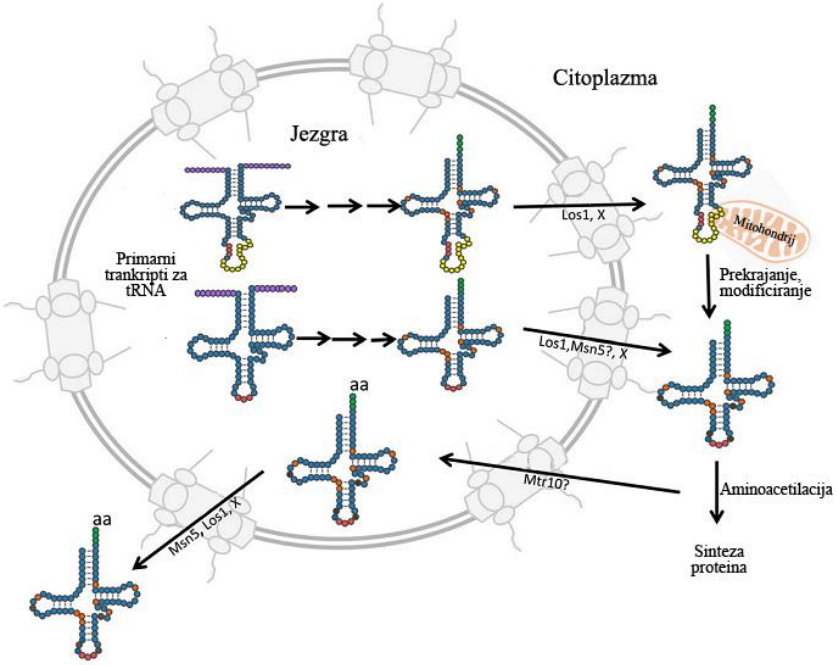
8. PUTOVANJE MOLEKULE tRNA KROZ EUKARIOTSKU STANICU TIJEKOM BIOGENEZE

Kretanje eukariotskih molekula tRNA između citoplazme i jezgre odvija se u tri osnovna koraka. U prvom novo transkribirana, djelomično procesirana tRNA izlazi u citoplazmu. Potom se vraća u jezgru nakon čega se ponovno može vratiti u citoplazmu. Ovi koraci upućuju na zadivljujući dinamiku molekule tRNA unutar eukariotske stanice.

8.1. Izlazak tRNA iz jezgre

Izmjena proteina, ribosoma i molekula tRNA između jezgre i citoplazme odvija se kroz jezgrine pore putem takozvanog Ran-puta. Ran je malena GTPaza koja se asocira s članovima obitelji importina-β čija podgrupa, eksportini, ima važnu ulogu u izlasku navedenih biomolekula i njihovih kompleksa iz jezgre. Po prelasku u citoplazmu trodjelni kompleks (Ran-eksportin-biomolekula) se inaktivira djelovanjem citoplazmatskog enzima RanGAP koji potiče GTPaznu aktivnost proteina Ran (Hopper, 2013.; Hopper i sur., 2010.). Ovime je onemogućen povratak kompleksa u jezgru. Glavni importin-β za prijenos tRNA iz jezgre u citoplazmu kralježnjaka je Xpo-t. Njegov homolog u kvascu (Los1) ima manje značajnu ulogu, u ovom prijenosu, i djeluje usporedno s više eksportera. Slično vrijedi i za PAUSED, homologa proteina Xpo-t pronađenog kod uročnjaka dok homolog proteina Xpo-t kukaca još uvijek nije zabilježen (Hopper, 2013.). Nadalje, poznato je kako Xpo-t i Los1 stupaju u interakciju s akceptorskom peteljkom te TΨC i D peteljka, ali ne i s antikodonskom rukom. Zbog neprepoznavanja antikodonske ruke ovi proteini nisu u mogućnosti razlikovati tRNA koje sadrže introne od onih koje su već prekrojene (Phizicky i Hopper, 2016.). Postoje naznake da bi Xpo-t i Los1 mogli sudjelovati u kontroli kvalitete molekule tRNA koja se prenosi u citoplazmu. Za mogućnosti izvršavanja ove zadaće važne su spomenute interakcije ovih proteina s dijelovima molekule tRNA koji su ispravno smotani (akceptorska, TΨC i D peteljke). Slijedi kako Xpo-t i Los1 u citoplazmu ne mogu prenijeti pogrešno smotane tRNA ili one molekule tRNA kojima krajevi nisu ispravno procesirani (Hopper, 2013.). Činjenica da Los1 ne stupa u interakciju s antikodonskom regijom, omogućuje mu prijenos molekula tRNA, koje sadrže introne, što je jako bitno jer se prekrajanje primarnih transkripata za tRNA kod kvasca odvija na površini mitohondrija (Sl. 10). Los1 je zasad jedini poznati eksportin kvasca, koji može prenositi transkript za tRNA koji sadrži introne. Ipak, zbog vijabilnosti mutanata *Δlos1* pretpostavlja se kako moraju postojati i drugi proteini s ovom funkcijom (Phizicky i Hopper, 2016.). Kod kvasca je primijećeno kako su koncentracije molekula tRNA u citoplazmi i jezgri regulirane

promjenama razine transkripcije i različitom distribucijom proteina Los1. Razina transkripcije regulirana je proteinom Maf1 koji negativno regulira transkripciju asocirajući se na RNA-polimerazu III. Aktivan oblik proteina Maf1, tj. onaj oblik koji se veže na RNA-polimerazu III, prisutan je u uvjetima stresa ili kada nije dostupan izvor ugljika koji je pogodan za dobivanje energije procesom vrenja. Kada su uvjeti povoljni za stanični rast Maf1 se fosforilira, i time inaktivira, što dovodi do aktivacije transkripcije RNA-polimerazom III (Hopper, 2013.;



Slika 10. Putovanje molekule tRNA kroz eukariotsku stanicu tijekom biogeneze. X na slici označava nepoznate proteine za koje se pretpostavlja da moraju biti uključeni u transport. Ukoliko nije u potpunosti potvrđeno kako neki protein sudjeluje u transportu označen je upitnikom. Preuzeto i preuređeno prema Hopper, 2013.

Phizicky i Hopper, 2016.). Nepovoljni uvjeti i oštećenja DNA mogu utjecati na količinu proteina Los1 u citoplazmi i jezgri. Oba faktora utječu na povišenje citoplazmatskog Los1 što rezultira smanjenjem broja molekula tRNA u jezgri (Hopper, 2013.). Xpo-5 i Msn5 također sudjeluju u izlasku tRNA i drugih makromolekula iz jezgre. Xpo-5 kralježnjaka tako primarno sudjeluje u eksportu miRNA dok u eksportu tRNA ima tek manju ulogu. U odnosu na Xpo-5, njegov homolog iz kvasca (Msn5) ima veću ulogu u prijenosu molekula tRNA. Nagađa se kako osim Msn5 i Los1 moraju postojati i drugi proteini (Sl. 10), koji sudjeluju u ovom procesu, jer su čak i dvostruke mutante vijabilne (Hopper, 2013.).

8.2. Retrogradni transport tRNA

Dugo se vremena smatralo kako, nakon transkripcije gena i procesiranja transkripta, tRNA izlazi iz jezgre u citoplazmu gdje se aminoacilira i sudjeluje u translaciji. Nekoliko otkrića je uzdrmalo ovu teoriju i potvrdilo postojanje retrogradnog prijenosa tRNA iz citoplazme u jezgru. Prvo otkriće je bilo prisutnost aminoacilacije u jezgri. Po ovom otkriću ispitivale su se i posljedice onemogućavanja aminoacilacije u jezgri. Tako je otkriveno da onemogućavanje aminoacilacije uzrokuje nakupljanje molekula tRNA u jezgri. Treće otkriće bilo je lokaliziranje izrezivanja introna iz transkripta kvasca u citoplazmi. Nadalje, primijećeno je i kako ako se kod kvasca onemogući aminoacilacija u jezgri, dolazi do nakupljanja prekrojene tRNA (Phizicky i Hopper, 2016.). Unos tRNA u jezgru nije u potpunosti razjašnjen i vjerojatno se odvija na više načina. Jedan od puteva je neovisan o Ran proteinu. U ovom putu sudjeluje protein toplinskog šoka Ssa2. Drugi otkriveni put je onaj ovisan o proteinu Ran. Otkriveno je da u ovom putu sudjeluje protein Mtr10, ali o njegovoj točnoj ulozi, u vidu prijenosa, postoje samo spekulacije (Sl. 10). Nije jasno razjašnjeno sudjeluje li Mrt10 direktno u mehanizmu ovog puta ili je tek član signalne kaskade koja regulira aktivnost puta (Hopper, 2013.). Retrogradni transport je, po svemu sudeći, očuvan i kod kralježnjaka. Čini se kako retrotranskripti HIV-a, uz ostale, koriste i retrogradni put molekula tRNA kako bi pristupili jezgrinom genomu (Phizicky i Hopper, 2016.). Grupe znanstvenika koje opovrgavaju ovu tvrdnju tvrde kako je retrogradni put zastupljen samo kod kvasca *S. cerevisiae* (Hopper, 2013.). Postoje dokazi koji ukazuju na ulogu retrogradnog puta u modifikaciji nukleotida molekule tRNA, regulaciji sinteze proteina i kontroli kvalitete molekule tRNA. Tako spomenuta modifikacija gvanozina na poziciji N_{73} $tRNA^{Phe}$ u vibutozin (yW) zahtijeva prekrajanje introna na površini mitohondrija, nakon čega se u jezgri G_{37} modificira u m^1G_{37}. Konačna transformacija iz m^1G_{37} u yW se odvija u citoplazmi pa tRNA po drugi put mora prijeći iz jezgre u citoplazmu. Ukoliko se stanica nađe u uvjetima nedostatka nutrijenata ili joj je onemogućena aminoacilacija, dolazi do inhibicije povratka u citoplazmu onih molekula tRNA koje su retrogradnim prijenosom prethodno vraćene u jezgru. Time se smanjuje razina translacije jer je zaliha (engl. *pool*) molekula tRNA u citoplazmi smanjena. Onemogućavanje retrogradnog prijenosa uvođenjem mutacija dovodi do nakupljanja aberantnih molekula tRNA što upućuje na ulogu ovog puta u kontroli kvalitete molekula tRNA. Retrogradnim prijenosom se pogrešno smotane tRNA, koje citoplazmatski put ubrzanog raspada molekula tRNA (RTD od engl. *rapid tRNA decay*) ne može prepoznati, prenose u jezgru gdje ih kao krivo strukturirane može prepoznati jezgrin RTD put ili put TRAMP (Hopper, 2013.).

8.3. Ponovni izlazak iz jezgre

Kako točno aminoacilirana tRNA ponovno izlazi iz jezgre, nije u potpunosti razjašnjeno. Los1 vjerojatno ne sudjeluje, ili ima manju ulogu, u ovom procesu jer on primarno transportira tRNA koje sadrže introne, a takve tRNA ne mogu biti aminoacilirane (Hopper, 2013.). Pretpostavlja se kako regulacija ovog puta ovisi o dostupnosti nutrijenata i kako bitnu ulogu u ovom procesu kod kvasca ima, već spomenuti, Msn5 koji sudjeluje u prijenosu zrelih tRNA iz jezgre u citoplazmu. Msn5 bi mogao biti reguliran dostupnošću nutrijenata i/ili biti direktno uključen u prijenos aminoaciliranih tRNA u citoplazmu (Phizicky i Hopper, 2016.). Implicirano je i sudjelovanje drugih proteina u ovom procesu, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ustanovila njihova uloga.

8.4. Unos molekule tRNA u mitohondrij

Iako mitohondrijski genom kvasca kodira dovoljan broj molekula tRNA, za potrebe translacije vlastitih mRNA neke se molekule tRNA unose iz citoplazme (Rubio i Hopper, 2011.). Razlozi unosa i točna uloga citoplazmatskih tRNA nisu u potpunosti razjašnjeni. Poznat je primjer kada u stresnim uvjetima $tRNA^{Lys}_{UUU}$, kodirana jezgrinim genomom, u mitohondriju translatira AAG kodon. Naime, zbog izostanka $cmnm5s^2U$ modifikacije kolebljive baze, mitohondrijska $tRNA^{Lys}_{UUU}$ u uvjetima stresa nije u mogućnosti translatirati spomenuti kodon (Hopper, 2013.).

9. LITERATURA

Abbott J.A., Francklyn C.S., Robey-Bond S.M., 2014. Transfer RNA and human disease. Front. Genet 5, 158.

Agrawal A., Mohanty B.K., Kushner S.R., 2014. Processing of the seven valine tRNAs in Escherichia coli involves novel features of RNase P. Nucl. Acids Res.

Bauerle M.R., Schwalm E.L., Booker S.J., 2015. Mechanistic diversity of radical S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. J. Biol. Chem. 290, 3995–4002.

Betat H., Long Y., Jackman J.E., Mörl M., 2014. From end to end: tRNA editing at 5'- and 3'-terminal positions. Int J Mol Sci 15, 23975–23998.

Boschi-Muller S., Motorin Y., 2013. Chemistry enters nucleic acids biology: enzymatic mechanisms of RNA modification. Biochemistry Mosc. 78, 1392–1404.

Chan P.P., Cozen A.E., Lowe T.M., 2011. Discovery of permuted and recently split transfer RNAs in Archaea. Genome Biol. 12, R38.

Cox M. M., Nelson D.L., 2013. Lehninger Principles of Biochemistry 6th Edition. W. H. Freeman & Company, 1057–1139.

Deutsch C., El Yacoubi B., De Crécy-Lagard V., Iwata-Reuyl D., 2012. Biosynthesis of threonylcarbamoyl adenosine (t6A), a universal tRNA nucleoside. J. Biol. Chem. 287, 13666–13673.

Drainas D., 2016. Antibiotics and RNase P. Antibiotics (Basel) 5. 15.

El Yacoubi B., Bailly M., De Crécy-Lagard V., 2012. Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. Annu. Rev. Genet. 46, 69–95.

Fujishima K., Kanai A., 2014. tRNA gene diversity in the three domains of life. Front Genet 5, 142.

Fujishima K., Sugahara J., Kikuta K., Hirano R., Sato A., Tomita M., Kanai A., 2009. Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 2683–2687.

Giegé R., Jühling F., Pütz J., Stadler P., Sauter C., Florentz C., 2012. Structure of transfer RNAs: similarity and variability. Wiley Interdiscip Rev RNA 3, 37–61.

Heinemann I.U., Söll D., Randau L., 2010. Transfer RNA processing in archaea: unusual pathways and enzymes. FEBS Lett. 584, 303–309.

Hopper A.K., 2013. Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Genetics 194, 43–67.

Hopper A.K., Pai D.A., Engelke D.R., 2010. Cellular dynamics of tRNAs and their genes. FEBS Lett. 584, 310–317.

Hori H., 2014. Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. Front Genet 5.

Klemm B.P., Wu N., Chen Y., Liu X., Kaitany K.J., Howard M.J., Fierke C.A., 2016. The Diversity of Ribonuclease P: Protein and RNA Catalysts with Analogous Biological Functions. Biomolecules 6.

Lai L.B., Vioque A., Kirsebom L.A., Gopalan V., 2010. Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects. FEBS Lett. 584, 287–296.

Machnicka M.A., Olchowik A., Grosjean H., Bujnicki J.M., 2014. Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. RNA Biol 11, 1619–1629.

Mörl M., Marchfelder A., 2001. The final cut. EMBO Rep 2, 17–20.

Phizicky E.M., Hopper A.K., 2015. tRNA processing, modification, and subcellular dynamics: past, present, and future. RNA 21, 483–485.

Phizicky E.M., Hopper A.K., 2010. tRNA biology charges to the front. Genes Dev. 24, 1832–1860.

Ramamurthy V., Swann S.L., Paulson J.L., Spedaliere C.J., Mueller E.G., 1999. Critical Aspartic Acid Residues in Pseudouridine Synthases. J. Biol. Chem. 274, 22225–22230.

Rogers H. H. i Griffiths-Jones S., 2014. tRNA anticodon shifts in eukaryotic genomes. RNA 20, 269–281

Rubio M.A.T., Hopper A.K., 2011. Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles. Wiley Interdiscip Rev RNA 2, 802–817.

Shepherd J., Ibba M., 2015. Bacterial transfer RNAs. FEMS Microbiol. Rev. 39, 280–300.

Stojkovic V., Fujimori D.G., 2015. Radical SAM-Mediated Methylation of Ribosomal RNA. Methods Enzymol 560, 355–376.

Su A. H., Randau L., 2011. A-to-I and C-to-U editing within transfer RNAs. Biochemistry Mosc. 76, 932–937.

Tsai H.-Y., Pulukkunat D.K., Woznick W.K., Gopalan V., 2006. Functional reconstitution and characterization of Pyrococcus furiosus RNase P. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 16147–16152.

Voet D., Voet J. G., 2011. Biochemistry 4th Edition. J. Wiley & Sons, Inc., 1345–1362.

http://modomics.genesilico.pl/modifications/ (Posjećeno 18. lipnja 2016.)

http://genesilico.pl/trnamodviz/jit_viz/select_tRNA/ (Posjećeno 18. lipnja 2016.)

10. SAŽETAK

Glavna tema ovog rada je procesiranje primarnog transkripta za tRNA. Molekule tRNA u stanici imaju veoma važne uloge. Osim njihove primarne uloge u translaciji, molekule tRNA sudjeluju i u staničnoj regulaciji i odgovoru stanice na stres. Funkcionalnost biomolekula je osigurana ispravnošću njihove konformacije, koja se stječe kroz različite procese sazrijevanja molekule. Molekule tRNA nisu iznimka od ovog pravila, pošto je ispravno obavljanje njihovih uloga od iznimne važnosti za normalno funkcioniranje stanice. Primarni transkripti uvelike se razlikuju od zrele, funkcionalne molekule tRNA i moraju proći kroz različite oblike posttranskripcijskog procesiranja kako bi sazreli. Ovo procesiranje kod većine organizama uključuje procesiranje krajeva, izrezivanje introna i uvođenje različitih modifikacija ribonukleotida. Rad nudi kratak uvod u svaki od ovih koraka uz navedene najbolje poznate primjere iz tri domene (Archaea, Bacteria, Eukaryota), a uz glavnu temu obrađene su i one usko povezane uz procesiranje poput raznolikosti gena za tRNA i putovanja molekula tRNA kroz eukariotsku stanicu tijekom biogeneze.

11. SUMMARY

Main topic of this paper is post-transcriptional processing of tRNA precursor molecule. In a cell, tRNA molecules play a very important role. Except their well-known primary role in translation, tRNA molecules are also involved in processes such as stress response and different cellular regulation pathways. In order to properly play their roles in the cell, biomolecules have to be folded correctly. tRNAs are not exceptions to this rule, since maintenance of processes that involve tRNA molecules is crucial for cell's viability. tRNA precursor molecules differ substantially from the mature tRNAs and, in order to become functional molecules, they have to undergo post-transcriptional processing. Processing mainly involves end processing, splicing, and ribonucleotide modifications. Paper offers a short introduction to each step with best known examples from all three domains of life (Archaea, Bacteria, Eukaryota). Except for the post-transcriptional processing, some closely related topics, such as diversity of tRNA genes and tRNA subcellular trafficking in eukaryotic cells, are also discussed.