

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

INTRONI GRUPE I U BAKTERIJAMA
BACTERIAL GROUP I INTRONS

SEMINARSKI RAD

Adriana Vučetić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2015

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. INTRONI GRUPE I.....	2
2.1. Osnovne značajke introna grupe I	2
2.2. Mehanizam prekrajanja introna grupe I.....	4
2.3. Intronski faktori i faktori kodirani domaćinom koji pomažu procesu izrezivanja introna	6
2.4. Ciljajuće endonukleaze kodirane intronima	7
2.5. Pokretljivost introna	9
2.6. Udomaćivanje introna grupe I i stvaranje novih genetičkih elemenata.....	10
2.7. Rasprostranjenost introna grupe I u bakterijskim genomima i genima	11
2.8. Evolucija složenih pokretnih elemenata	13
3. ZAKLJUČAK	16
4. LITERATURA	17
5. SAŽETAK.....	20
6. SUMMARY	20

1. UVOD

Introni grupe I su široko rasprostranjene nekodirajuće RNA molekule pronađene u genomima jezgre, kloroplasta i mitohondrija u eukariotima, te u eubakterijskim i virusnim genomima. Ove intervencijske sekvence nalaze se unutar tRNA, rRNA i mRNA gena i sadrže različite nukleotidne sekvence. Međutim imaju karakterističnu sekundarnu i tercijarnu strukturu koja im omogućuje samoizrezivanje (Zhou i sur. 2008). Otkriće sposobnosti introna grupe I da se samostalno izrezuju i djeluju kao ribozimi prvi put je pokazala grupa znanstvenika na jednostaničnoj eukariotskoj praživotinji *Tetrahymena thermophila*, otkrivši 414 nukleotidni intron u preteći 23S rRNA molekule (Hausner i sur. 2014). Efikasan proces prekrajanja introna *in vivo* uključuje proteine kodirane intronima ili domaćinom koji pomažu prilikom uspostave nativne konformacije molekula RNA (Waldsich i sur. 2002).

Samoizezujući introni mogu se podijeliti u dvije opće skupine: introni koji sadrže otvorene okvire čitanja, ORF-ove (engl. *open reading frame*) i oni koji ne sadrže ORF-ove. Unutar introna mogu se nalaziti geni za ciljajuće endonukleaze, HEaze (engl. *homing endonuclease*). HEaze su mjesno specifični DNA enzimi koji uvode dvolančane lomove u molekulu DNA i potiču rekombinacijski popravak loma. Introni grupe I koji sadrže ORF-ove za HEaze su pokretni genetički elementi koji se mogu kretati po genomu ugrađujući se u alele bez introna (Scalley-Kim i sur. 2008). Prvi eksperimenti koji su pokazali povezanost između DNA endonukleaza i pokretljivosti introna dobiveni su proučavanjem mitohondrijske DNA kvasca unutar omega (ω) lokusa. Sparivanjem dva kvasca, jednog sa ω lokusom i drugog bez lokusa, rezultiralo je većom frekvencijom nasljeđivanja ω lokusa. Predložena je hipoteza o neovisnoj evoluciji introna grupe I i ciljajućih endonukleaza, te postoje neki dokazi da je došlo do invazije gena za HEaze unutar intronskih sekvenci (Hausner i sur. 2014).

Filogenetička rasprostranjenost introna grupe I je raznolika, najviše su pronađeni u jezgrinim rDNA genima gljiva, biljaka i algi, rjeđe u genomima bakterija, bakteriofaga, virusa i organela, a u genomima arheja do sad nisu pronađeni (Haugen i sur. 2007). Također uočeni su neki genetički elementi koju su nastali tijekom evolucije introna s domaćinskim genomom, tako da su sami introni i njihove HEaze poprimili nove funkcije i pridonijeli razvoju novih genetičkih elemenata koji imaju važne uloge u regulaciji bioloških puteva različitih stanica unutar organizama (Kaiser i sur. 2009).

2. INTRONI GRUPE I

2.1. Osnovne značajke introna grupe I

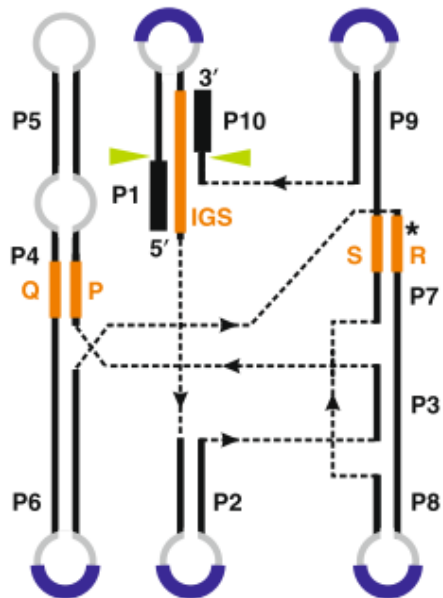
Introni grupe I dijele karakteristične strukturne značajke koje usmjeravaju reakcije prekrajanja. Samoizrezivanje introna događa se u dvije reakcije transesterifikacije koje su omogućene zbog prostorne konformacije molekula RNA, koju poprima tijekom smatanja. Uspoređujući nukleotidnu sekvencu introna uočava se varijabilnost u primarnoj strukturi. Međutim introni grupe I dijele karakteristične konzervirane sekundarne i tercijalne strukture (Burke i sur. 1987; Hausner i sur. 2014).

Sekundarnu strukturu introna grupe I čine: spareni elementi, P (engl. *paired*), petlje, L elementi (engl. *loop*) i vezujući elementi, J (engl. *joining*). P elementi su dvostruke zavojnice koje nastaju sparivanjem komplementarnih baza u molekuli RNA i označavaju se P1-P10 prema položaju od 5' do 3' kraja lanca RNA (Burke i sur. 1987). U nekim intronskim sekvencama prepoznate su kratke konzervirane sekvence nazvane P, Q, R i S koje čine srž zavojitih P elemenata (npr. P sekvencu se sparuje Q sekvencom i čini P4 element, a R se sparuje s S i čini P7 element) (Hausner i sur. 2014). L elementi su jednolančane regije koje se nastavljaju na P elemente i označavaju ovisno kojoj peteljki pripadaju. J elementi su građeni od nukleotida koji se nalaze između P elemenata (slika 1) (Burke i sur. 1987).

P1 i P10 elementi čine veznu domenu za supstrat tako da se 5' i 3' mjesto prekrajanja pozicioniraju jedan u blizini drugoga. Aktivna srž ribozima introna grupe I je građena od dvije domene: potporna domena koja se sastoji od P4, P5 i P6 elemenata i katalitička domena koju čine P3, P7, P8 i P9 zavojnice. P2 element je u nekim intronima grupe I odsutan. Katalitička domena ima vezni utor za gvanozin-5-fosfat (GTP) u P7 zavojnici. Vezanjem egzogenog GTP, slobodna 3'-OH skupina je postavljena tako da može napasti 5'-3'-fosfodietersku vezu u 5' mjestu prekrajanja u P1 zavojnici (Hausner i sur. 2014). Proučavanjem kristalne strukture ribozima dobiveni su strukturni dokazi da su za ovaj proces potrebna najmanje dva dvovalentna metalna iona u aktivnom mjestu introna grupe I (slika 1) (Stahley i Strobel 2005).

Intronska sekundarna struktura varira ovisno po primarnoj sekvenci nukleotida u molekuli RNA. Studije koje su proučavale kristalnu strukturu i biokemijske procese ukazuju da intronski specifični sekundarni elementi uvelike utječu na tercijarnu strukturu ribozima. Stoga se introni grupe I dijele u 5 razreda: A, B, C, D i E na temelju konzerviranosti sržnih domena, konformaciji sekundarnih struktura i prisutnosti perifernih elemenata. Svaki razred je dalje podijeljen u podgrupe, danas poznato 14 podgrupa ovisno o prisutnosti specifičnih strukturnih značajki (Zhou i sur. 2008; Hausner i sur. 2014).

Neki od introna grupe I sadrže otvorene okvire čitanja koji kodiraju specifične endonukleaze. ORF-ovi se najčešće nalaze ugrađeni u L elemente, izvan aktivne srži ribozima i ne utječu na smatanje ribozima i proces prekrajanja (slika 1) (Hausner i sur. 2014).

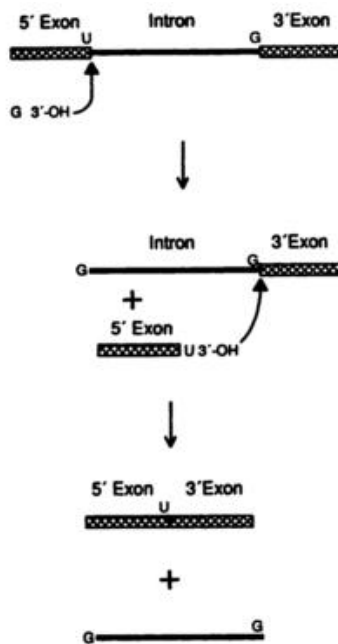


Slika 1. Model sekundarne strukture introna grupe I. P elementi označeni P1-P10 punim crnim linijama, L elementi su prikazani sive boje, J elementi su prikazani isprekidanim sterelicama, kratke konzervirane sekvence P, Q, R, S označene su naranačastim linijama, plave linije upućuju na regije gdje se mogu nalaziti ORF-ovi koji kodiraju HEaze, dok zelene strelice označavaju 5' i 3' mjesto prekrajanja između introna i eksona, G vezno mjesto označeno je zvijezdicom (slika preuzeta iz Hausner i sur. 2014).

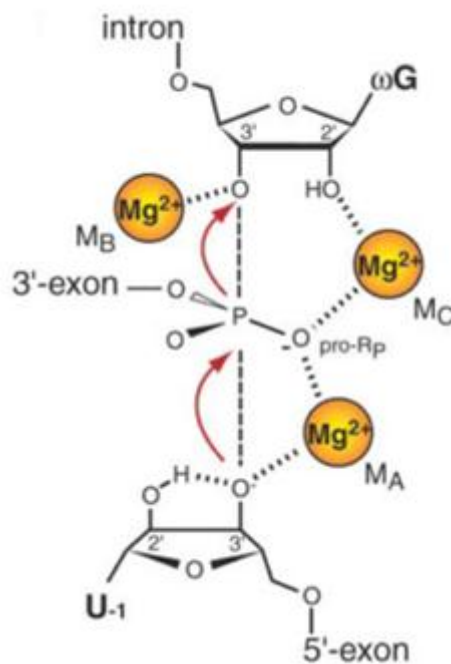
2.2. Mehanizam prekrajanja introna grupe I

Introni grupe I nalaze se unutar prekursorskih tRNA, rRNA i mRNA molekula, a izrezuju se samostalno pomoću autokatalitičke aktivnosti koja je posljedica uspostavljanja karakteristične tercijarne strukture (Zhou i sur. 2008). 5' i 3' mjesto prekrajanja definirano je sparivanjem baza između krajeva introna i bočnih eksonskih sekvenci. Unutarnja vodeća sekvenca, IGS (engl. *internal guide sequence*) je kratka intronska sekvenca koja se sparuje sa sekvencom uzvodnog eksona tvoreći P1 zavojnicu i prepoznaje 5' mjesto prekrajanja. 3' mjesto prekrajanja nalazi se na P10 zavojnici koja nastaje sparivanjem kratke sekvence uzvodnog eksona s IGS (Saldanha i sur. 1993; Hausner i sur. 2014).

Mehanizam izrezivanja introna grupe I događa se u dvije reakcije transesterifikacije. Inicijalni nukleofil je egzogeni GTP (α GTP) koji se veže u gvanozin (G) vezno mjesto koje čini P7 zavojnica unutar katalitičke domene, zatim slobodna 3'-OH skupina α GTP napada 5' mjesto prekrajanja. Nakon prve reakcije transesterifikacije nastaje međuprodukt, α GTP vezan 3'-5'-fosfodieterskom vezom na 5'-kraj introna. Ovaj korak je praćen konformacijskim promjenama koje omogućuju zamjenu α GTP s 3' terminalnim gvanozinom (ω G) uzvodne eksonske sekvence u G-vezno mjesto. Zatim slijedi druga reakcija transesterifikacije, 3'-OH skupina ω G nukleofilno napada 3' mjesto prekrajanja tako da dolazi do ligacije nizvodnog i uzvodnog eksona i otpuštanja izrezanog introna (slika 2) (Saldanha i sur. 1993; Hausner i sur. 2014). Reakcije izrezivanja introna grupe I u potpunosti ovise o dvovalentnom metalnom ionu koji stabilizira tercijarnu strukturu ribozima i aktivira nukleofilne napade 3'-OH skupinama (slika 3) (Stahley i Strobel 2005).



Slika 2. Mehanizam prekrajanja introna grupe I. Prva reakcija transesterifikacije započinje nukleofilnim napadom α GTP na 5' kraj introna. Druga reakcija transesterifikacije posredovana je nukleofilnim napadom 3'-OH eksona na 3' kraj introna. Produkti reakcija su spojene uvodna i nizvodna sekvenca eksona i izrezan intron (slika preuzeta iz Saldanha i sur. 1993).



Slika 3. Prikaz stabilizacije strukture introna grupe I u 3' mjestu prekrajanja uz pomoć tri iona magnezija (slika preuzeta iz Stahley i Strobel 2005).

2.3. Intronski faktori i faktori kodirani domaćinom koji pomažu procesu izrezivanja introna grupe I

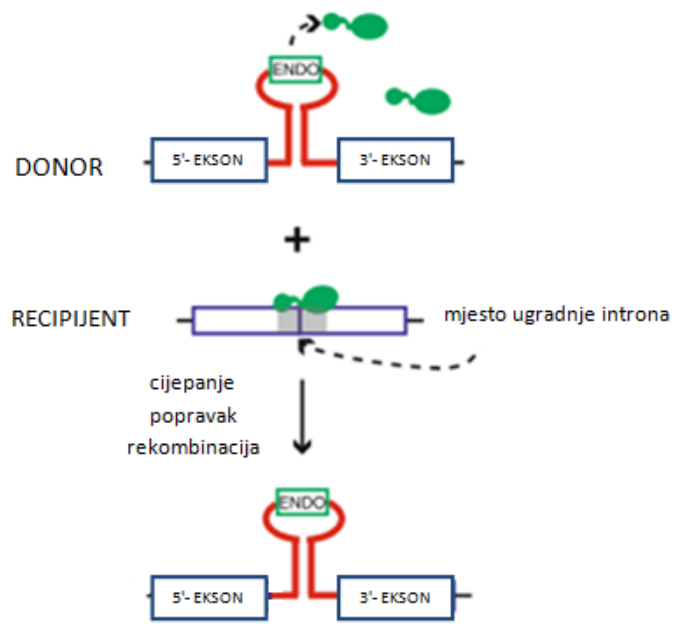
Efikasan proces prekrajanja introna *in vivo* uključuje proteine kodirane intronima ili domaćinom koji pomažu prilikom uspostave native konformacije RNA molekula (Waldsich i sur. 2002). Sami introni mogu kodirati za enzime maturaze koje kao i neki domaćinski faktori imaju funkciju kofaktora u reakcijama prekrajanja, jer utječu na brzinu katalize i osiguravaju minimalan ili nikakav fenotipski efekt na funkciju domaćinskog gena (Hausner i sur. 2014).

Neke studije pokazuju da introni grupe I stupaju u interakcije sa staničnim RNA vezujućim proteinima i omogućuju nastanak RNA struktura kompetentnih za prekrajanje. Tako su u organizmu *Neurospora crassa* pronađene tri mutacije u jezgrinim genima *cyt-4*, *cyt-18* i *cyt-19* koje daju citokromsko deficijentni fenotip. Posljedice ovih mutacija su defektno izrezivanje mL2449 introna grupe I. Cyt-4 je protein slična RNazi-II i uključen je u izrezivanje introna, Cyt-18 je tirozil-tRNA sintetaza koja stabilizira smatanje RNA u aktivni ribozim i stoga omogućuje prekrajanje introna, a Cyt-19 je član DEAD-*box* proteinske superobitelji RNA helikaza i ima ulogu RNA šaperona koji prepoznaje i destabilizira krivo smotane RNA molekule (Hausner i sur. 2014). Eksperimenti na fagu T4 bakterije *Escherichiae coli* pokazali su da domaćinski faktori poput proteina StpA mogu djelovati kao RNA šaperon i kompenzirati defekte prekrajanja *in vivo*. Protein StpA ima sposobnost ubrzavanja reakcije prekrajanja introna unutar gena za timidialt sintazu (gen *td*) i potiče sparivanje baza u RNA (Waldsich i sur. 2002). Pronađeni su još mnogi proteini bakterije *E. coli* koji pomažu prekrajanu introna grupe I faga T4. Ribosomski protein S12 može imati ulogu RNA šaperona tako što nespecifično veže RNA molekule i osigurava pravilno smatanje u terciarnu strukturu (Coetzee i sur. 1994). Ova opažanja također ukazuju da su izrezivanje introna i ekspresija gena međusobno koordinirani procesi te stoga introni ne mogu biti neutralnog utjecaja na stanicu domaćina (Hausner i sur. 2014).

2.4. Ciljajuće endonukleaze kodirane intronima

Navođenje (eng. *homing*) je proces prijenosa invertiranih genetičkih sekvenci (npr. introna ili inteina) u homologno alelnu mjesto koje ne sadrži tu sekvencu, što dovodi do konverzije gena i prijenosa pokretnog genetičkog elementa (Scalley-Kim i sur. 2008). Ciljajuće endonukleaze su mjesno - specifični DNA enzimi koji prepoznaju i cijepaju specifična ciljna mjesta u genomu koja ne sadrže introne. Imaju ulogu prenošenja pokretnih genetičkih elemenata, uključujući vlastite ORF-ove, uvodeći dvolančani lom u molekulu DNA (slika 4) (Wilson i Edgell 2009). HEaze i pokretni introni su pronađeni u genomima faga, bakterija, arheja, protista i organelima algi i gljiva. Mjesta prepoznavanja HEaza su duge DNA sekvence, najčešće od 14 - 40 pb, koje se nalaze na mjestu insercije introna i obuhvaćaju sekvencu DNA uzvodno i nizvodno od mjesta ugradnje introna. Prisustvo introna grupe I u ciljnom mjestu čine te alele otporne na cijepanje HEazama što predstavlja mehanizam razlikovanja alela sa i bez introna. Mnoge HEaze toleriraju nukleotidnu supstituciju u ciljnim mjestima, omogućavajući cijepanje varijanti srodnih ciljnih mjesta koja nastaju genetičkim driftom (Scalley-Kim i sur. 2008; Hausner i sur. 2014).

Postoji 6 obitelji HEaza klasificiranih prema konzerviranim aminokiselinama koje se nalaze u katalitičkom mjestu endonukleaze, to su LAGLIDADG, H-N-H, His-Cys kutija, GIY-YIG, PD-(D/E)xK, and EDxHD obitelji. Struktura aktivnog mjesta HEaza koje pripadaju obiteljima His-Cis kutija i H-N-H je veoma slična, stoga se pretpostavlja da su divergentni članovi $\beta\beta\alpha$ - metal motiva. Također sličnu strukturu aktivnog mjesta pokazuju PD-(D/E)xK i EDxHD obitelji endonukleaza. LAGLIDADG obitelj je najveća i najraznovrsnija skupina sa širokim rasponom domaćina. GIY-YIG, H-N-H, PD-(D/E)xK, i EDxHD enzimi su najčešće kodirani intronima grupe I u genomu faga i manje učestalo u intronima koji se nalaze unutar gena u bakterijskom kromosomu. His-Cis kutija enzimi imaju ograničenu filogenetsku rasprostranjenost, pronađeni su skoro isključivo u protistima (Belfort i Roberts 1997; Hausner i sur. 2014).



Slika 4. Mehanizam ugradnje introna grupe I pomoću HEaza kodiranih samim intronima (slika preuzeta i prilagođena iz Hausner i sur. 2014).

2.5. Pokretljivost introna

Pokretanje introna grupe I započinje stvaranjem dvolančanog loma ili ureza u DNA molekuli HEazom u alelima koji ne sadržavaju introne, a dovršava se uz pomoć popravka dvolančanog loma ili sintezom ovisnom sparivanju lanaca, SDSA (engl. *synthesis dependent strand annealing*). HEaze mogu poticati pokretanje introna uvođenjem jednolančanog ureza, ali točan mehanizam poticanja rekombinacije na ovaj način nije poznat. Alel koji sadrži intron je donor DNA sekvence za popravak loma u recipijetnom alelu bez introna, a rezultat je nerekiprončni prijenos pokretnog intronskog elementa (Hausner i sur. 2014). Proces pokretanja je često povezan sa ko-konverzijom bočnih markera unutar intronskog insercijskog mjesta. HEaze mogu ostati vezane za pocijepane produkte tako da sprječavaju pristup rekombinacijskim enzimima i enzimima popravaka oštećenja DNA, te time utječu na ko-konverziju eksona (Mueller i sur. 1996).

Opće mišljenje je da se introni grupe I šire po genomu unutar populacija alela bez introna i brzo okupiraju sva slobodna ciljna mjesta procesom „super Mendelovog“ nasljeđivanja. Na taj način HEaze mogu akumulirati veliki broj mutacija koje inaktiviraju enzime ili promjene ulogu enzima. Također se smatra da introni grupe I mogu izbjeći ugradnju unutar populacije alela bez introna transpozicijom u nova mjesta, mehanizmom reverzibilnog prekrajanja. Reverzibilno prekrajanje je proces obrnut od procesa prekrajanja i omogućuje ugradnju introna u RNA molekule (Hausner i sur. 2014). Tijekom procesa reverznog prekrajanja 4-6 baza unutarnje vodeće sekvence P1 elementa prepoznaje i komplementarno se sparuje s insercijskim mjestom domaćinske RNA molekule i intron biva ugrađen u RNA ekson. Predloženi mehanizam pokretanja introna u genomu zahtijeva dodatne procese, reverznu transkripciju reverznog izrezanog introna i domaćinske RNA u cDNA te integraciju cDNA u genom pomoću rekombinacije. Eksperimenti s prototipom introna trepetljikaša *Tetrahymena* pokazali su da je proces reverznog prekrajanja moguć *in vitro* i unutar bakterijskog sistema (Birgisdottir i Johansen 2005). Unutar carstva gljiva filogenetičkom analizom širenja introna grupe I pokazano je da postoje rDNA introni koji su se ugradili u ektopična mjesta unutar rDNA gena reverznim procesiranjem (Bhattacharya i sur. 2005). Ektopična integracija, odnosno transpozicija, introna grupe I može biti povezana sa specifičnošću HEaza kodiranih intronima. Neke HEaze mogu prepoznati i pocijepati sekvence slične nativnim mjestima cijepanja i time potaknuti pokretanje introna. Međutim frekvencija pokretanja introna ovisi o brzini cijepanja ciljnog mjesta, a HEaze sporo cijepaju ektopična mjesta stoga dolazi do smanjene transpozicije introna (Hausner i sur. 2014).

2.6. Udomaćivanje introna grupe I i stvaranje novih genetičkih elemenata

Pronađeno je nekoliko primjera udomaćivanja introna grupe I sa domaćinskim genomom ili s drugim grupama pokretnih genetičkih elemenata tako da su nastali novi genetički elementi s različitim ulogama (Hausner i sur. 2014).

Protein WhiA iz bakterije *Streptomyces coelicolor* je sporulacijski regulatorni faktor koji pripada obitelji regulatornih proteina DUF199. Kristalna struktura proteina DUF199/WhiA prikazuje da ovi proteini imaju bipolarnu strukturu, gdje je struktura N-terminalne domena ista kao u monomernoj LAGLIDADG HEazi, a C-terminalna domena je zavojnica-okret-zavojnica, HTH (engl. *helix-turn-helix*) slična bakterijskom σ faktoru. N-terminalna regija LAGLIDADG HEaze je izgubila sposobnost vezanja metalnog iona pa time i katalitičku aktivnost, ali sadrži povećanu DNA-veznu aktivnost. Ovaj primjer pokazuje invaziju genetičkih elemenata koji su se transformirali tijekom evolucije u nove proteine koji sudjeluju u regulaciji kompleksnih bioloških puteva (Kaiser i sur. 2009).

U bakterijskoj vrsti *Clostridium difficile* pronađeni su alosterički samoizrezujući introni koji djeluju kao metabolički senzori i s obzirom na to svojstvo predstavljaju genetičke regulatore gena za virulenciju. Svojstvo introna grupe I da tvore tercijarne strukture bakterijska stanica je iskoristila tako da imaju ulogu dvokomponentnog riboprekidača sa sposobnošću vezanja alosteričkih aktivatora. C-di-GMP vezni aptamer nalazi se uzvodno od introna grupe I u 5'-UTR regiji i vezanjem aptamera mijenja se konformacija introna grupe I i pomiče se 5' mjesto prekrajanja. Stoga u prisutnosti c-di-GMP, procesiranje RNA vodi nastanku mRNA u kojoj je ribosomsko vezno mjesto pomaknuto uzvodno od start kodona, a proces prekrajanja bez prisustva aptamera vodi uklanjanju veznog mjesta ribosoma kao dijela introna i ne dolazi do translacije mRNA (Lee i sur. 2010).

Složeni genetički elementi opisani su u nekim enterotoksičnim sojevima *Clostridium difficile* u genu *tcdA* unutar lokusa za patogenost bakterija. Cd/St1 element je pronađen unutar ORF-a enterotoksina TcdA-C34, a pokazuje strukturu karakterističnu intronima grupe I i insercijskim sljedovima, IS elementima, te predstavlja novu skupinu genetičkih elemenata prilagođenih preživljavanju i širenju u eubakterijskim genomima. Ovaj kimerni ribozim složen je od introna grupe I kompetentnog za prekrajanja i IS605 transpozona s genima za dvije transpozaze i nazvan je IStron (Braun i sur. 2000). IStroni imaju sposobnost transpozicije između gena, ali njihov kapacitet samoizrezivanja je minimaliziran, te stoga imaju ograničenu filogenetsku rasprostranjenost (Hausner i sur. 2014).

2.7. Rasprostranjenost introna grupe I u bakterijskim genomima i genima

Introni grupe I su široko rasprostranjeni DNA elementi, pronađeni su više u eukariotskim genomima usporedbi s prokariotskih genoma (Del Campo i sur. 2009). Većina introna grupe I su pronađeni u jezgrinim rRNA genima te u genomima plastida i mitohondrija gljiva i protista. Manji broj ih je pronađen u genomima bakteriofaga, virusa i bakterija. Introni grupe I prisutni u bakterijama većinski su ugrađeni u strukturne RNA gene kao što su tRNA i rRNA geni. Neki od gena u kojima su pronađeni samoizrezujući introni su geni *recA* i *nrde* bakterije *Bacillus anthracis*, gen *tmRNA* bakterije *Clostridium botulinum*, gen *thyA* bakterije *Bacillus mojavensis*, gen RIR cijanobakterije *Nostoc punctiforme*, geni rRNA bakterija *Coxiella burnetii*, *Dimkania negevensis* i *Thermosynechococcus elongatus*. Introni grupe I još nisu pronađeni u arhejama (Haugen i sur. 2007).

Skolonost introna grupe I da se ugrade u strukturne gene može se objasniti konzerviranom strukturom tih gena. Insercija introna u protein kodirajuće gene, nastanak ribozima i samo prekrajanja mogu ometati transkripciju i translaciju gena jer se odvijaju istovremeno u bakterijskoj stanici, što predstavlja barijeru ugradnje introna grupe I u ove gene (Hausner et al. 2014). Iako su pronađeni neki bakterijski proteinski geni koji sadrže inserciju introna grupe I, primjeri su: gen *nrde* (Meng i sur. 2007), gen *recA* (Ko i sur. 2002) i gen za flagelin (Hayakawa i Ishizuka 2009). Istraživajući ciljajuće endonukleaze bakteriofaga T4, pronađeno se da se ORF-ovi nalaze unutar samoizrezujućih introna grupe I ugrađenih u protein kodirajuće gene. Naime svi promatrani introni grupe I se nalaze unutar protein kodirajućih gena faga usprkos prisutnosti mnogih gena tRNA (Edgell i sur. 2010). Ovakva rasprostranjenost introna grupe I u genomima faga može biti povezana s konzerviranom sekvencom koje je ciljno mjesto cijepanja HEaza, a nalazi se u protein kodirajućim genima što u kontekstu genoma faga uključuje mali kodirajući potencijal genoma (Hausner et al. 2014).

Introni grupe I do sad nisu pronađeni u genomima arheja, te je prekrajanje svih RNA molekula u arhejama identično. Introni arheja bili oni u pre-tRNA ili drugim RNA molekulama se izrezuju uz pomoć tRNA prekrajajućih endonukleza. Izrezivanje introna arheja ovisno je o endonukleazama i ligazama koje su preuzele ulogu ribozima, jer je sami proces efikasniji i smanjuje bilo kakav fenotipski efekt na genom (Tocchini-Valentini i sur. 2011).

Rasprostranjenost introna grupa I u bakterijskom genomu ovisi i nekoliko faktora: 1) utjecaja na fenotip, 2) dostupnost alela bez introna koje mogu prepoznati HEaze, 3) prisutnost

i efikasnost homologne rekombinacije kao sustava popravaka dvolančanog loma, te 4) dostupnost DNA ili RNA prijenosnih mehanizma kao što je prirodna transformacija, konjugacija i transdukcija. Nedavni rad na bakteriji *Bacillus cereus* pokazuje da su neki genomski *recA*, *nrdE* i *nrdF* introni slični intronima faga, što upućuje na mogućnost da infekcija fagima služi kao vektor za lateralni prijenos introna među različitim genomima, iako je i dalje malo dokaza koji to potvrđuju (Hausner et al. 2014). Ugradnjom introna iz roda *Tetrahymena* u gen za 23S rRNA u *E. coli* dolazi do sporijeg rasta bakterija zbog sporog procesiranja ugrađenog introna. Također je pokazano da intronska RNA povezana s 50S ribosoma ometa translaciju (Nikolcheva i Woodson 1997).

2.8. Evolucija složenih pokretnih elemenata

Kako je već navedeno, pokretni introni grupe I sastoje se iz dvije funkcionalne i strukturne domene: intronska srž koja čini karakterističnu sekundarnu i tercijarnu RNA strukturu sposobnu za prekrajanje i periferne petlje koje sadrže ORF-ove za HEaze koje omogućuju pokretanje introna (Scalley-Kim i sur. 2008). Postoje dokazi koji podržavaju hipotezu da su srž introna i ORF evoluirali neovisno. Kao prvo pronađeni su usko povezni introni grupe I koji sadrže različite ORF-ove na različitim pozicijama, primjer u fagu T4 i gljivici roda *Nesurospora*. Pronalazak HEaza kodiranih intronima arheja koji su strukturno različiti i imaju drukčiji put prekrajanja pruža dokaz o neovisnom porijeklu uloga prekrajanja i pokretanja. Također, ORF-ovi koji kodiraju HEaze imaju sposobnost proteinskog prekrajanja direktno iz protein kodirajuće sekvence, neovisno RNA prekrajućim kompleksima. Pokazano je da pokretljivost introna ovisi o ORF, ali ne ovisi o srži introna, stoga se pretpostavlja da su se HEaze neovisno nekoliko puta ugradile u intronsku sekvencu. Alternativna teorija da su introni grupe I oduvijek imali endonukleazni gen je problematična zbog mnogo razloga, uključujući činjenicu da mnogi introni ne sadrže ORF-ove i da su direktno nastali iz katalitičkih RNA porijeklom iz RNA svijeta. Predložena su dva mehanizma nastanka složenih pokretnih introna (Loizos i sur. 1994).

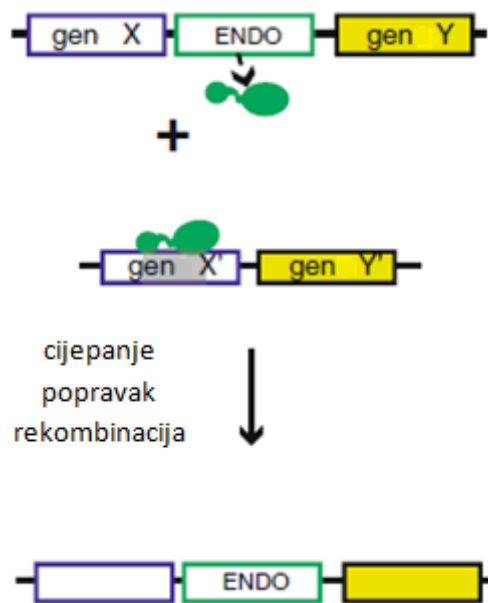
Intronska sekvenca gena *sunY* faga T4 sadrži bočne sljedove oko ORF-a za I-TeVII endonukleazu slične upravo eksonskoj sekvenci koju ciljano napada I-TeVII. Nadalje intron gena *sunY* kodira za endonukleazu I-TeVII, koja je sposobna vezati i cijepati umjetni konstrukt koji sadrži fuzioniranu uzvodnu i nizvodnu sekvencu uz ORF I-TeVII. Ovaj rezultat je dokaz za hipotezu endonukleazne invazije unutar introna grupe I, gdje HEaze cijepaju intronsku sekvencu koja sadrži ciljno mjesto slično mjestu cijepanja HEaze, zatim tijekom rekombinacijskom popravka, endonukleazna genska sekvenca se ugradi u pocijepanu intronsku sekvencu (Loizos i sur. 1994).

Novije studije predlažu drugi mehanizam porijekla pokretanja introna nazvan „udruženo ciljanje“ (engl. *collaborative homing*). Preživljavanje endonukleaza koje se ugrađuju u introne ovisi o sposobnosti provođenja intronske pokretljivosti. Endonukleaze moraju ili brzo mijenjati svoju specifičnost za mjesto cijepanja i ugradnje, ili moraju biti već prilagođene cijepanju ciljne sekvence. Rad se temelji na proučavanju dva faga i njihovih slobodnih HEaza i introna grupe I bez ORF-ova (slika 5). Pokazano je da je intron gena za DNA polimerazu faga Φ I pokretan genetički element koji ovisi o intronskom HNH endonukelaznom genu za I-TsII HEazu. Gen za DNA polimerazu faga T3 ne sadrži intron, a

nalazi se u blizini gena 5.3 koji kodira za HEazu koja ima sposobnost širenja gena 5.3 u gene za DNA polimerazu slodnih faga. Obje endonukleaze cijepaju gene za DNA polimerazu bez introna u istim ciljnim sekvencama. Ciljno mjesto cijepanja odgovara mjestu ugradnje introna, tako da su endonukleaze prilagođene da cijepaju mjesto ugradnje introna i potiču ilegitimnu rekombinaciju kojom dolazi do pomicanja gena slobodne endonukleaze u mjesto ugradnje introna. Na temelju ovih dokaza predloženo je da introni i njihove ciljajuće endonukleaze evoluiraju odvojeno, ali da ciljaju iste visoko konzervirane sekvence, te tako na brzi način nastaju složeni pokretni elementi (Bonocora i Shub 2012).

Neovisno o porijeklu pokretljivih introna grupe I, invazija endonukleaza u intronske sekvence ima utjecaj na proces izrezivanja introna. Zanimljivo je istaknuti da su ORF-ovi umetnuti u petlje koje ne ometaju smatanje i prekrajanje RNA molekula. Neke ciljajuće endonukleaze imaju i ulogu maturaza te djeluju kao kofaktori u procesu prekrajanja. HEaze kodirane intronima i domaćinski faktori stabiliziraju tercijarnu strukturu intronske RNA ili onemogućavaju njihovo krivo smatanje (Belfort 2003).

Samoizrezujući introni ovise o HEazama kao vrsti parazitskih genetičkih elemenata. Kada se introni šire i fiksiraju unutar populacije, HEaze više nisu pod selektivnim pritiskom i njihova aktivnost se može spontanim procesima izgubiti. Međutim, neke analize parazitskih genetičkih elemenata pokazuju da funkcionalne HEaze opstaju tijekom dugih evolucijskih razdoblja u populacijama i vrsta koje su aseksualne (Gogarten i Hilario 2006). Povlači se pitanje zašto su se introni grupe I s pridruženim HEazama uspješno proširili po genomima organela biljaka, protozoa i gljiva, a imaju veoma ograničenu rasprostranjenost u genomima bakterija i bakteriofaga. Neki znanstvenici predlažu da su introni evoluirali kao parazitske sebične RNA molekule s katalitičkim aktivnostima u abiotičkim kompartmentima za vrijeme RNA svijeta. Međutim ako su doista starog porijekla, začuđujuća je činjenica kako danas imaju ograničenu rasprostranjenost (potpuno su odsutni među arhejama i rijetki u bakterijama). Jedna zanimljiva mogućnost je da sustav CRISPR/Cas obrane genoma od stranih DNA ima ulogu i ograničenoj rasprostranjenosti introna grupe I. Na primjer, tip III sustava CRISPR/Cas ciljano restriksijski uklanja jednolančane RNA molekule. Također u prilog ovoj teoriji ide činjenica da se sustav CRISPR/Cas značajno proširio među arhejama, za razliku od bakterija što odgovara odsutnosti introna grupe I među arhejama (Hausner i sur. 2014).



Slika 5. Mehanizam „udruženog ciljanja“ - ugradnja gena za homing endonukleazu u intron grupe I (slika preuzeta i prilagođena iz Hausner i sur. 2014)

3. ZAKLJUČAK

Introni su izuzetno bitni dijelovi molekule DNA, odnosno molekule RNA koji su važni za strukturu i funkciju samih genoma. Mutacije mogu nastati unutar introna jednako kao što nastaju bilo gdje drugdje unutar genoma. Iako ne moraju uzrokovati probleme, ako se dogode na mjestu bitnom za prekrajanje mogu utjecati na daljnju sudbinu RNA molekula, primjerice stvaranje novog mjesta prekrajanja zbog kojeg mogu nastati nefunkcionalne RNA molekule ili nastaje preuranjeni stop kodon unutar protein kodirajućih RNA.

Istraživanja samoizrezujućih introna daju temeljne uvide u kemijske procese katalizirane RNA molekulama i time omogućuju spoznaje u evoluciji katalitičkih proteina, proteinskoj sintezi i samom porijeklu introna. Rasprava oko evolucije introna i dalje traje, pretpostavka je se da su nastali iz katalitičkih RNA molekula koje su bile prisutne u RNA svijetu što ostavlja prostora znanosti da istraži porijeklo introna i omogućuju razumijevanje činjenice da su opstali u organizmima unatoč činjenici da im se ne zna uloga. Danas se smatra da su introni nastali rano tijekom evolucije života na Zemlju, ali su ih prokariotski organizmi, koji su prilagođeni vrlo brzom rastu, izgubili. Ograničena rasprostranjenost introna među bakterijama odgovara opisu da su oni sebični genetički elementi.

Mehanizmi koji potiču ali i sprječavaju širenje introna grupe I unutar bakterijskih genoma su slabo istraženi, te stoga nije poznata u potpunosti uloga i dugoročan utjecaj introna na preživljenje organizama. Prisutnost introna se fenotipski ne očituje, ali prisutnost intronskih faktora i faktora domaćina koji pomažu samom procesu prekrajanja može utjecati na fenotip domaćina ukoliko im je funkcija promijenjena. Također važno je naglasiti da su introni poprimili regulatorne uloge djelujući kao riboprekidači ili pridonijeli svojim genom za endonukleaze u razvoju novih proteina unutar bakterijskih stanica, što upućuje da njihovo prisustvo može biti izvor novih genetičkih elemenata. Buduća istraživanja bi se se trebala usredotočiti na direktno razumijevanje utjecaja introna na domaćinske genome.

4. LITERATURA

Belfort M: Two for the price of one: a bifunctional intron-encoded DNA endonuclease-RNA maturase. *Genes Dev* 2003, 17:2860–2863.

Belfort M, Roberts RJ: Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res* 1997, 25:3379–3388.

Bhattacharya D, Reeb V, Simon DM, Lutzoni F: Phylogenetic analysis suggests reverse splicing spread of group I introns in fungal ribosomal DNA. *BMC Evol Biol* 2005, 5:68.

Birgisdottir AB, Johansen S: Site-specific reverse splicing of a HEG-containing group I intron in ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 2005, 33:2042–2051.

Bonocora RP, Shub DA: A likely pathway for formation of mobile group I introns suggested by an intron endonuclease and its fre-standing homologue that cleave identical intron insertion sites. *Changes* 2012, 29:997-1003.

Braun V, Mehlig M, Moos M, Rupnik M, Kalt B, Mahony DE, von Eichel- Streiber C: A chimeric ribozyme in *Clostridium difficile* combines features of group I introns and insertion elements. *Mol Microbiol* 2000, 36:1447–1459.

Burke JM, Belfort M, Cech TR, Davies RW, Schweyen RJ, Shub DA, Szostak JW, Tabak HF: Structural conventions for group-I introns. *Nucleic Acids Res* 1987, 15:7217–7222.

Del Campo EM, Casano LM, Gasulla F, Barreno E: Presence of multiple group I introns closely related to bacteria and fungi in plastid 23S rRNAs of lichen-forming *Trebouxia*. *Int Microbiol* 2009, 12:59–67.

Coetzee T, Herschlag D, Belfort M: *Escherichia coli* proteins, including ribosomal protein S12, facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones. *Genes Dev* 1994, 8:1575–1588.

Edgell DR, Gibb EA, Belfort M: Mobile DNA elements in T4 and related phages. *Virology* 2010, 27:290.

Gogarten JP, Hilario E: Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC Evol Biol* 2006, 6:94.

Haugen P, Bhattacharya D, Palmer JD, Turner S, Lewis LA, Pryer KM: Cyanobacterial ribosomal RNA genes with multiple, endonuclease-encoding group I introns. *BMC Evol Biol* 2007, 7:159.

Hausner G, Hafez M, Edgell DR: Bacterial group I introns: mobile RNA catalysts. *Mobile DNA* 2014, 5:8.

Hayakawa J, Ishizuka M: A group I self-splicing intron in the flagellin gene of the thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009, 73:2758–2761.

Kaiser BK, Clifton MC, Shen BW, Stoddard BL: The structure of a bacterial DUF199/WhiA protein: domestication of an invasive endonuclease. *Structure* 2009, 17:1368–1376.

Ko M, Choi H, Park C: Group I self-splicing intron in the *recA* gene of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 2002, 184:3917–3922.

Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, Sudarsan N, Breaker RR: An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* 2010, 329:845–848.

Loizos N, Tillier ER, Belfort M: Evolution of mobile group I introns: recognition of intron sequences by an intron-encoded endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:11983–11987.

Meng Q, Zhang Y, Liu XQ: Rare group I intron with insertion sequence element in a bacterial ribonucleotide reductase gene. *J Bacteriol* 2007, 189:2150–2154.

Mueller JE, Smith D, Belfort M: Exon coconversion biases accompanying intron homing: battle of the nucleases. *Genes Dev* 1996, 10:2158–2166.

Nikolcheva T, Woodson SA: Association of a group I intron with its splice junction in 50S ribosomes: implications for intron toxicity. *RNA* 1997, 3:1016–1027.

Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM: Group I and group II introns. *FASEB J* 1993, 7:15–24.

Scalley-Kim M, McConnell-Smith A, Stoddard BL: Coevolution of a homing endonuclease and its host target sequence. *J Mol Biol* 2007, 2:1305–1319.

Stahley MR, Strobel SA: Structural evidence for a two-metal-ion mechanism of group I intron splicing. *Science* 2005, 309:1587–1590.

Tocchini-Valentini GD, Fruscoloni P, Tocchini-Valentini GP: Evolution of introns in the archaeal world. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:4782–4787.

Waldsich C, Grossberger R, Schroeder R: RNA chaperone StpA loosens interactions of the tertiary structure in the td group I intron in vivo. *Genes Dev* 2002, 16:2300–2312.

Wilson GW, Edgell DR: Phage T4 mobE promotes trans homing of the defunct homing endonuclease I-TevIII. *Nucleic Acids Res* 2009, 37:7110–7123.

Zhou Y, Lu C, Wu Q-J, Wang Y, Sun Z-T, Deng J-C, Zhang Y: GISSD: group I intron sequence and structure database. *Nucleic Acids Res* 2008, 36 (Database issue):D31–D37.

5. SAŽETAK

Introni grupe I su intervencijski sljedovi koji se nalaze unutar tRNA, rRNA i protein kodirajućih gena u bakterijama i bakteriofagima, te su također pronađeni u genima jezgre, kloroplasta i mitohondrija eukariota. Ovi introni se nalaze unutar RNA gena i njihovo prekrajanje iz prekursorske RNA je katalizirano vlastitom ribozimskom aktivnošću, kao posljedica dobro definirane tercijarne strukture. Efikasno prekrajanje introna grupe I *in vivo* najčešće zahtijeva interakcije sam staničnim RNA - vezujućim proteinima ili faktorima kodiranim od samih introna koji omogućuju stvaranje strukture kompetentne za prekrajanje. Neki samoizrezujući introni kodiraju ciljajuće endonukleaze (HEaze) koje imaju sposobnost širenja introna u alele bez introna, stoga su neki introni pokretni genetički elementi. Introni grupe I imaju ograničenu rasprostranjenost među bakterijama i smatra se da nemaju utjecaj na fenotip. Međutim neki introni imaju prilagođene funkcije tako da djeluju kao riboprekidači ili je došlo do udomaćivanja gena za HEaze što upućuje da mogu biti izvor novih genetičkih elemenata. Jedno od najzanimljivijih pitanja je evolucijsko porijeklo pokretnih introna grupe I. Trenutačno se smatra da HEaze i pokretni introni grupe I imaju različito porijeklo.

6. SUMMARY

Group I introns are intervening sequences that have invaded tRNA, rRNA and protein coding genes in bacteria and their phages, and are also found in the nuclear, chloroplast and mitochondrial genomes of eukaryotes. These introns interrupt RNA genes, and their splicing from precursor RNAs is catalyzed by acting as ribozymes, by folding to a well-defined three-dimensional structure. Efficient *in vivo* splicing of group I introns often requires interaction with cellular RNA-binding proteins or with intron-encoded factors that promote the formation of splicing-competent RNA structures. Some group I introns are mobile genetic elements due to encoded homing endonuclease (HEases) genes that promote their spread to intronless alleles. Group I introns have a limited distribution among bacteria and the current assumption is that they are phenotypically neutral, yet the co-opting of intron functions by a riboswitch or the domestication of intron-encoded homing endonuclease as a regulatory protein indicates that introns can be a source of genetic novelty. One of the most intriguing questions about mobile group I introns concerns their evolutionary origin. The current consensus is that HEases and group I introns had distinct evolutionary origins.