

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Marković

**Mehanizmi alternativnog prekrajanja u
biljaka**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb

Faculty of Science
Department of Biology

Iva Marković

Mechanisms of alternative splicing in plants

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski studij Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dunje Lejak-Levanić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Mehanizmi alternativnog prekrajanja u biljaka

Iva Marković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Alternativno prekrajanje pre-mRNA je ključan mehanizam regulacije u eukariota koji omogućuje stvaranje više izoformi mRNA iz jednog gena, proširujući raznolikost proteina. Proces alternativnog prekrajanja u biljaka je i dalje većinski neistražen, no procjenjuje se da do 70% gena u biljaka generira više izoformi. Alternativno prekrajanje ima ulogu u regulaciji stabilnosti transkripta, funkcije proteina i njihove lokalizacije, čime utječe na razvoj biljaka i njihov odgovor na stres. Novi alati za analizu transkriptoma omogućuju napretke u istraživanjima alternativnog prekrajanja. U ovom radu dan je pregled osnovnih mehanizama alternativnog prekrajanja, njegovog utjecaja na raznolikost proteina, evolucije, uloge u razvoju biljaka i alata za njegovu identifikaciju.

Ključne riječi: procesiranje RNA, spliceosom, razvoj biljaka
(18 stranica, 4 slike, 80 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Mechanisms of alternative splicing in plants

Iva Marković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Alternative splicing of pre-mRNA is a crucial regulatory mechanism in eukaryotes that generates multiple mRNA isoforms from a single gene, thus expanding protein diversity. The process of alternative splicing in plants remains largely unexplored, but it is estimated that up to 70% of genes in plants generate multiple isoforms. Alternative splicing plays a role in regulating transcript stability, protein function and localization, thereby influencing plant development and response of plants to stress. Advances in transcriptome analysis tools have enabled progress in studying alternative splicing. This paper provides an overview of the fundamental mechanisms of alternative splicing, its impact on protein diversity, evolution, roles in plant development, and tools for its identification.

Keywords: RNA processing, spliceosome, plant development
(18 pages, 4 figures, 80 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

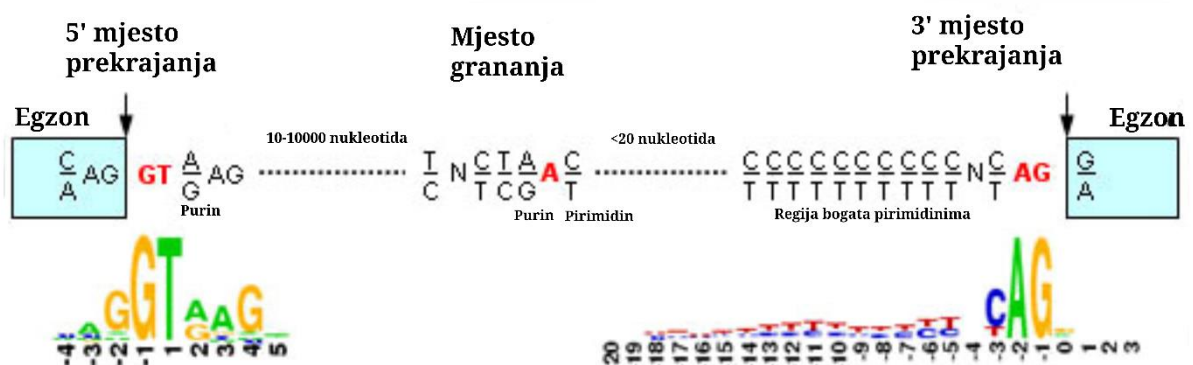
Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Sadržaj

2.1. Mehanizam alternativnog prekrajanja u biljaka	4
2.2. <i>Cis</i> regulatorni elementi prekrajanja.....	5
2.3. <i>Trans</i> -regulatorni elementi prekrajanja	6
2.3.1 Proteini bogati serinom i argininom (SR)	6
2.3.2. Heterogeni jezgrini nukleoproteini (snRNP).....	8
3. Alternativno prekrajanje i raznolikost proteina	8
4. Evolucija prekrajanja	10
5. Funkcije alternativnog prekrajanja u razvoju biljaka i stresu	12
5.1. Alternativno prekrajanje tijekom razvoja biljaka	12
5.2. Alternativno prekrajanje i odgovor biljaka na stres	14
6. Alati za identifikaciju prekrajanja	15
7. Zaključak i perspektive.....	16
Literatura	16

1. Uvod

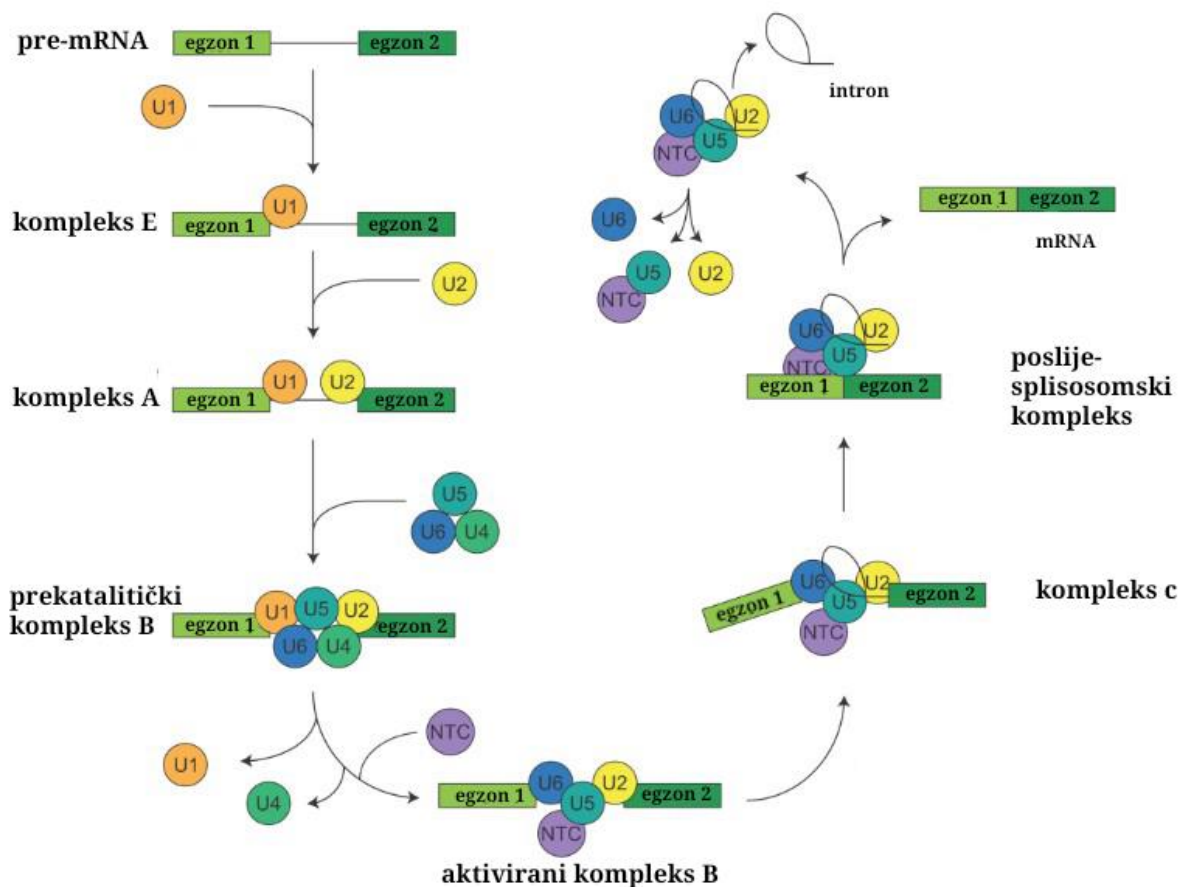
Jedan od važnih koraka u ekspresiji gena u eukariota je prekrajanje, proces koji podrazumijeva izrezivanje nekodirajućih sekvenci, introna i spajanje kodirajućih sekvenci, egzona, iz pre-mRNA kako bi nastala zrela molekula mRNA. Ovaj proces se odvija kotranskripcijski i najčešće ga provodi spliceosom, makromolekularni kompleks malih jezgrinih ribonukleoproteina (snRNP, od eng. *small nuclear ribonucleoprotein*) i većeg broja pomoćnih proteina (Carvalho i sur. 2013). Veličina i broj introna znatno se razlikuju od vrste do vrste, ali točno prepoznavanje introna je korak koji je konzerviran u svih eukariota (Gehring i Roignant 2021). Introni su definirani pomoću kratkih sljedova koji barem djelomično prate konsenzus sekvencu: 5' mjesto prekrajanja s konzerviranim GT slijedom, 3' mjesto prekrajanja s konzerviranim AG slijedom, točka grananja s adenilatom 18 do 40 nukleotida uzvodno od 3' mjesta prekrajanja i polipirimidinski trakt (Slika 1; Barbazuk i sur. 2008; Reddy i sur. 2013).



Slika 1. Konsenzus sekvence introna na razini DNA. N označava bilo koji nukleotid. Veličina slova u donjem redu razmjerna je s očuvanošću tih nukleotida u sekvenci. Preuzeto s GeneInfinity 2023.

Mali jezgrini ribonukleoproteini u spliceosomu sastoje se od malih jezgrinih molekula RNA bogatih uracilom (U snRNA, od eng. *uridine rich small nuclear RNA*) i proteina vezanih za njih. Male jezgrine RNA su nekodirajuće i ne sadrže poli-A rep. Spliceosom sadrži pet U snRNA koje zajedno s proteinima čine male jezgrine ribonukleinske komplekse U1, U2, U4, U5 i U6. Proces prekrajanja počinje interakcijom sparivanjem baza između snRNP U1 i komplementarne sekvence na 5' mjestu prekrajanja. Zatim dvije podjedinice U2 pomoćnog

faktora stupaju u interakciju s granicom između introna i egzona na 3' mjestu prekrajanja i polipirimidinskim traktom čime nastaje kompleks E. U2 snRNP veže točku grananja i tvori kompleks A. sidrenjem međusobno vezanih U4, U5 i U6 snRNP-a na U2 snRNP nastaje prekatalitički kompleks B, koji se aktivira nakon rearanžmana unutar kompleksa i otpuštanja U1 i U4 snRNP-a. U aktivaciji kompleksa B sudjeluje kompleks proteina zvan NTC (od eng. *Nineteen complex*). Pre-mRNA se prvo cijepa na 5' mjestu prekrajanja i ligiranjem 5' kraja introna na adozin u točki grananja intron poprima oblik larijata, što dovodi do stvaranja kompleksa C koji katalizira cijepanje 3' mjestu prekrajanja (Slika 2; Meyer i sur. 2015). Osim ovog tipa spliceosoma postoji i U12 tip spliceosoma koji cijepaju takozvani U12 tip introna koji nije toliko brojan u životinja, ali je češći u biljaka (Reddy i sur. 2013).

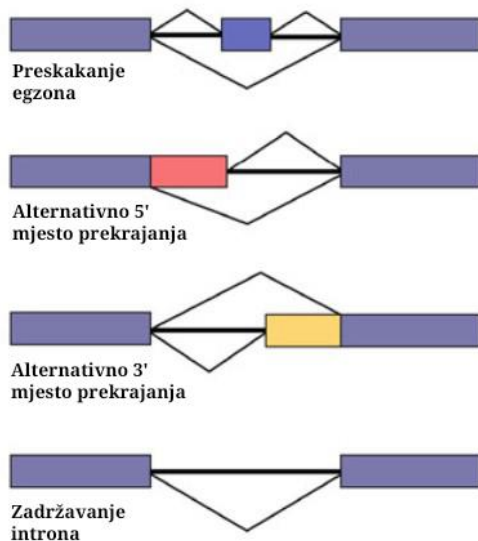


Slika 2. Proces prekrajanja. Kvadrati prikazuju egzone, a linija između njih intron. U1, U2, U4, U5 i U6 su mali jezgrini ribonukleoproteini, a NTC kompleks *Nineteen* (Meyer i sur. 2015).

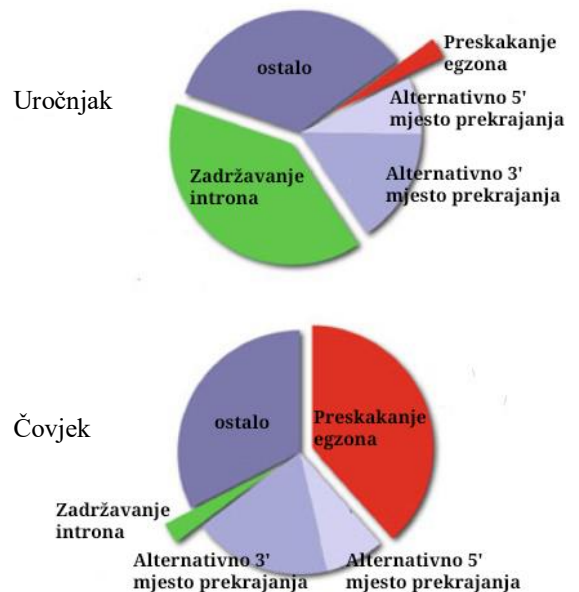
Spliceosom može diferencijalno prepoznati ili preskočiti mjesta prekrajanja što dovodi do alternativnog prekrajanja čime nastaje više izoformi mRNA. Najčešći oblici alternativnog prekrajanja su preskakanje egzona, alternativna 5' i 3' mjesta prekrajanja i zadržavanje introna (Slika 3). Alternativno prekrajanje može utjecati na raznolikost proteoma različitim strukturama i izmijenjenim funkcijama proteina kao rezultat promjene u kodirajućoj regiji, ili promjenom stabilnosti mRNA uzrokovanom promjenom u nekodirajućoj regiji. U slučaju da alternativnim prekrajanjem nastane izoforma koja sadrži preuranjeni stop kodon, ona neće biti translatirana, nego će postati meta signalnog mehanizma degradacije molekula mRNA s besmislenim mutacijama (NMD, od eng. *nonsense-mediated decay*; Barbazuk i sur. 2008).

Proces slaganja spliceosoma na definiranim mjestima prekrajanja kontroliraju *cis* regulatorni elementi koji privlače dodatne RNA vezujuće proteine. Ove sekvence se mogu nalaziti u intronima i egzonima, a po funkciji mogu biti pojačivači i prigušivači prekrajanja. Osim *cis* regulatornih elemenata, ulogu u prekrajanju imaju i proteini koji djeluju *in trans*, a svrstavaju se u dvije kategorije: proteini bogati serinom i argininom (SR, od eng. *Serine Arginine*) koji sadrže motive koji prepoznaju RNA i domenu obogaćenu serinom i argininom koja stupa u interakcije s proteinima, i heterogeni jezgrini ribonukleoproteini (hnRNP, od eng. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein*), obitelj RNA vezujućih proteina koji sudjeluju u više koraka procesiranja mRNA uključujući prekrajanje. Utjecaj regulatornih elemenata na prekrajanje ovisi o kontekstu u kojem se nalaze i oni mogu imati sasvim različite uloge ovisno o tome jesu li vezani za egzone ili introne (Meyer i sur. 2015).

A. Osnovni tipovi alternativnog prekrajanja



B. Distribucija u uročnjaka i čovjeka



Slika 3. A. Prikaz najčešćih oblika alternativnog prekrajanja. Plavi pravokutnici na lijevom i desnom rubu prikazuju konstitutivne egzone, a ostali dijelove egzona uključene u alternativno prekrajanje. Horizontalne linije prikazuju introne, a dijagonalne slučajeve alternativnog prekrajanja. B. Zastupljenost različitih oblika alternativnog prekrajanja u uročnjaka i čovjeka, preuzeto iz Carvahlo i sur. 2013.

2. Alternativno prekrajanje u biljaka

Znanje o prekrajanju i alternativnom prekrajanju u biljaka je vrlo limitirano u usporedbi sa znanjem o tim procesima u životinja. Dostupnost sekvenci cijelih genoma biljaka omogućila je identifikaciju ortologa glavnih komponenti u prekrajanju, iz čega se može zaključiti da su osnovni principi prekrajanja u životinja primjenjivi i u biljaka (Wang i Brendel 2004). Iako su osnovni principi konzervirani, postoje razlike u prepoznavanju introna. Poznato je da introni sisavaca ne mogu biti pravilno izrezani u biljnoj stanici, dok se neke pre-mRNA mogu pravilno prekrojiti u stanicama HeLa, što ukazuje na to da postoje određene specifičnosti u mašineriji biljaka (Barbazuk i sur. 2008; Wiebauer i sur. 1988). Procjenjuje se da u biljaka do 70% gena stvara više od jedne izoforme (Szakonyi i Duque 2018).

2.1. Mehanizam alternativnog prekrajanja u biljaka

Postoje važne razlike između biljnih i animalnih introna. Introni biljaka su relativno kratki, s prosječnom duljinom od 160 pb, u usporedbi s animalnim intronima čija je prosječna duljina 5 kb. Konsenzus sekvence za mjesta prekrajanja i točka grananja u biljaka i životinja su usporedive, no u biljaka su one znatno manje konzervirane te je polipirimidinski trakt u biljaka odsutan a zamjenjuje ga regija bogata uridinom (Barbazuk i sur. 2008; Reddy i sur. 2013). Osim razlika u intronima, zapažene su i razlike u učestalosti različitih tipova alternativnog prekrajanja. Dok je u ljudi najčešći tip prekrajanja preskakanje egzona, a najrjeđi retencija introna, u uročnjaku i riži je retencija introna tip prekrajanja s jako velikom učestalošću (~40%), dok je preskakanje introna vrlo rijedak slučaj alternativnog prekrajanja (Barbazuk i sur. 2008; Carvalho i sur. 2013). U biljaka je zapažena jasna razlika u omjeru AU i GC baza u intronima i egzonomima. Introni su bogatiji adeninom i uracilom, a u dvosupnica je ta razlika još veća nego u jednosupnica (Reddy i sur. 2013).

U usporedbi s animalnim spliceosomom, koji je dobro istražen, biljni još nije izoliran i njegov točan sastav nije poznat. Međutim, iz sekvenciranih genoma biljaka mogu se usporedbom sa

sekvencama životinja pretpostaviti ortologne sekvence koje kodiraju za njegove komponente. Tom metodom nađeno je 74 snRNA i 395 gena koji kodiraju za proteine koji grade spliceosom ili sudjeluju u prekrajanju, ukazujući na konzerviranost mašinerije (Lim i Burge 2001; Wang i Brendel 2004). U uročnjaku je nađeno oko 2000 ranije spomenutih introna tipa U12 koji se javljaju najčešće jednom po transkriptu i prekrajaju sporijom kinetikom. U njihovom prekrajanju sudjeluje U12 tip spliceosoma koji se sastoji od malih jezgrenih ribonukleoproteina U11, U12, U4atac, U5, i U6atac (Reddy i sur. 2013).

Alternativno prekrajanje utječe na stabilnost transkripta pojavom preuranjenih stop kodona u izoformama koje su zatim degradirane u citoplazmi putem NMD. Put NMD put se aktivira u prvom krugu translacije, kada temeljni proteini ovog puta, UPF1, UPF2 i UPF3, privuku proteine za degradaciju mRNA. Mašinerija za NMD je konzervirana u biljaka i identificirani su ortolozi dijela animanih proteina koji sudjeluju u putu. Glavne značajke supstrata za NMD su duge 3' netranslatirane regije i introni u njima te preuranjeni stop kodon više od 50 do 55 nukleotida uzvodno od mjesta prekrajanja (Kertész i sur. 2006; Nyikó i sur. 2009). Sve te značajke mogu biti rezultat alternativnog prekrajanja (Reddy i sur. 2013).

2.2. *Cis* regulatorni elementi prekrajanja

Osim konsenzus sekvenci za mjesta prekrajanja i točku grananja, primarni transkripti sadrže i kratke konzervirane sekvence duljine 5 do 10 nukleotida koje mogu promovirati ili suprimirati prekrajanje na određenim mjestima, a imaju ulogu i u konstitutivnom i u alternativnom prekrajanju (Barbazuk i sur. 2008; McManus i Graveley 2011). To su prigušivači i pojačivači prekrajanja, a mogu se nalaziti u intronima ili egzonima, često tvoreći klastere. Istraživanja *cis* regulatornih elemenata su pokazala da se oni najčešće pojavljuju u egzonima, iako se mogu nalaziti i u intronima, a sami po sebi slabog su učinka, no u većem broju kopija vežu regulatorne proteine (Ladd i Cooper 2002; Reddy i sur. 2012). Regulatorni proteini zatim privlače ili stabiliziraju komponente spliceosoma ili utječu na vezanje proteina koji inhibiraju prekrajanje. Najbolje istraženi regulatorni elementi su egzonski pojačivači prekrajanja koji se javljaju u velikom broju egzona i na sebe vežu proteine SR, te egzonski prigušivači prekrajanja koji vežu proteine hnRNP i reprimiraju interakcije uključene u slaganje spliceosoma (Barash i sur. 2010; Chasin 2007). U životinja su *cis* regulatorni elementi dovoljno dobro poznati da se iz motiva u sekvencama mogu pretpostaviti mogući rezultati prekrajanja (Barash i sur. 2010), dok su biljne sekvence koje vežu proteine još nepoznate, unatoč tome što je veliki broj tih proteina identificiran (Lorković 2009).

Sekundarne i tercijarne strukture molekula pre-mRNA također mogu imati utjecaj na prekrajanje. Maskiranje mjesta prekrajanja raznim strukturnim elementima može suprimirati prekrajanje, dok se razrješenjem tih struktura prekrajanje pojačava (Reddy i sur. 2013). Dodavanjem sekundarne strukture stabljika-petlja na 5' kraj ili sredinu introna pokazana je jaka inhibicija prekrajanja u protoplastima vrste *Nicotiana tabacum*, no inhibicija nije opažena kad je struktura bila dodana na 3' kraj introna, što ukazuje na regulatornu ulogu sekundarnih struktura u biljaka (Goodall i Filipowicz 1991; Liu i sur. 1995). Poznate su dvije sekundarne strukture koje u biljaka reguliraju prekrajanje *in vivo*: ribosklopke, koje služe kao vezno mjesto za metabolite, i imitacija ribosomske RNA 5S, koja veže RNA vezujuće proteine. Pretpostavlja se da sekundarne i tercijarne strukture RNA omogućuju regulaciju prekrajanja u različitim uvjetima bez potrebe za RNA vezujućim proteinima jer su osjetljive na vezanje liganada, osmolite, koncentracije iona i promjene u temperaturi (Lambert i Draper 2007; Mullen i sur. 2012). S obzirom na to da se prekrajanje odvija kotranskripcijski, prekrajanje posredovano sekundarnom i tercijarnom strukturom pre-mRNA uvjetovano je brzinom prekrajanja jer se neke strukture mogu formirati samo u slučaju kad je transkripcija spora (Reddy i sur. 2013).

2.3. Trans-regulatorni elementi prekrajanja

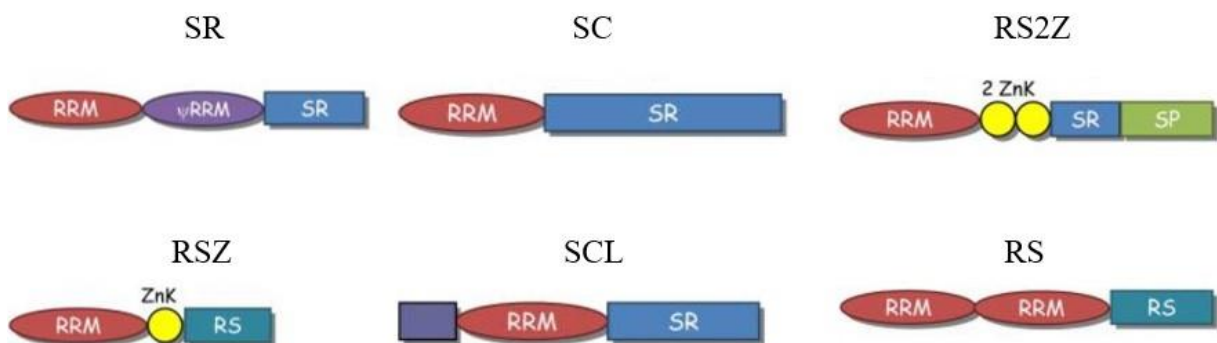
U *Arabidopsis thaliana* postoji više od 800 proteina s jednom ili više RNA vezujućih domena (Silverman i sur. 2013). Veliki broj proteina koji vežu RNA u biljaka nemaju ortologe u životinja. Osim proteina koji su dio spliceosoma, važnu ulogu u prekrajanju imaju porodica proteina bogatih serinom i argininom - proteini SR, i porodica heterogenih jezgrinih nukleoproteina - hnRNP. Osim što su ovi proteini regulatori prekrajanja, i njihova pre-mRNA je podvrgnuta alternativnom prekrajanju (Reddy i sur. 2013).

2.3.1 Proteini bogati serinom i argininom (SR)

Regulatorni proteini SR sadrže jedan ili dva motiva prepoznavanja RNA na N-terminalnom kraju i regiju bogatu serinom i argininom na C kraju (Barta i sur. 2010). U biljaka je istražena samo njihova uloga u prekrajanju, dok je u životinja poznato da imaju ulogu i u daljnjem procesiranju i metabolizmu mRNA (Lopato i sur. 1999b; Reddy i sur. 2013). Proteini SR specifično stupaju u interakcije s pre-mRNA preko motiva prepoznavanja RNA, a s proteinima preko regije bogate serinom i argininom. Neki proteini SR imaju i motive cinkovih prstiju koji također omogućuju interakcije proteina s RNA (Lopato i sur. 1999a). Proteini SR interagiraju s ostalim proteinima uključenima u prekrajanje te međusobno tvore kompleksne interakcijske mreže i na taj način reguliraju prekrajanje. Ekspresija proteina SR varira među različitim tkivima, što ukazuje na specifičnost njihovog vezanja (Lopato i sur. 1999b, 1999a; Reddy i sur.

2013). Neki proteini SR su auto-regulirani alternativnim prekrajanjem, čime nastaju izoforme s preuranjenim stop kodonom, od kojih se oko pola degradira degradacijskim putem NMD (Lopato i sur. 1999b; Palusa i Reddy 2010). Dio tih događaja je evolucijski konzervirano što ukazuje na njihovu fiziološku važnost (Iida i Go 2006).

Broj gena koji kodiraju za proteine SR u biljaka je duplo ili gotovo duplo veći od njihovog broja u kralješnjaka, što je rezultat duplikacije cijelog genoma koja je u biljaka česta. *A. thaliana* sadrži 18 proteina SR svrstanih u šest porodica, od kojih tri porodice čine ortolozi ljudskih porodica ASF/SF2 (SR u *A. thaliana*), 9G8 (RSZ u *A. thaliana*) i SC35 (SC u *A. thaliana*), dok su ostale tri, RS2Z, RS i SCL, specifične za biljke (Slika 4; Richardson i sur. 2011). Osim njih, poznat je i protein nalik proteinu SR, SR45 s dvije domene RS, koji je homologan RNA vezujućem proteinu S1 sisavaca (Lykke-Andersen i sur. 2001). Ovaj protein postoji u dvije izoforme s razlikom u duljini od 8 aminokiselina nastale biranjem alternativnog 3' mjesta prekrajanja. Kraća varijanta komplementira defekte mutanta sr45 u rastu korijena, a dulja u razvoju latica, implicirajući njihove fiziološke uloge (Meyer i sur. 2015; Zhang i Mount 2009).



Slika 4. Shematski prikaz porodica proteina SR. RRM označava motiv prepoznavanja RNA, SR označava regiju bogatu serinom i argininom, RS označava domenu s karakterističnim dipeptidima serina i arginina, SP označava domenu bogatu serinom i prolinom, a ZnK domenu cinkovih prstiju. ΨRRM u porodici SR predstavlja motiv prepoznavanja RNA sa specifičnim evolucijski konzerviranim motivom. Prikaz je preuzet iz Barta i sur. 2010.

Proteini SR su lokalizirani u nukleoplazmi i tzv. međukromatinskim granulama, nemembranskim strukturama bogatim proteinima SR, snRNP-ima i drugim faktorima. Proteini SR su u jezgri vrlo mobilni, i alterniraju između pozicija u nukleoplazmi i granulama procesom

kontroliranim forforilacijom i defosforilacijom (Reddy i sur. 2013). Prije se mislilo da međukromatinske granule služe samo kao zaliha faktora prekrajanja, no dokazano je da se posttranskripcijsko prekrajanje može odvijati i u njima (Girard i sur. 2012).

2.3.2. Heterogeni jezgrini nukleoproteini (snRNP)

Drugi tip proteina regulatora prekrajanja u biljaka su heterogeni jezgrini ribonukleoproteini (hnRNP). Veliki broj hnRNP-a se nalazi u jezgri, ali dio ih je uključen u prijenos iz jezgre u citoplazmu reguliran posttranslacijskim modifikacijama (Reddy i sur. 2013; Wachter i sur. 2012). Najistraženiji proteini ove skupine su proteini PTB (od eng. *polypirimidine tract binding proteins*, proteini koji vežu polipirimidinski trakt), koji u sisavaca aktiviraju ili reprimiraju selekciju određenih mjesta prekrajanja. U *A. thaliana* su identificirana tri njihova ortologa: AtPTB1, AtPTB2 i AtPTB3. Sva tri gena alternativnim prekrajanjem generiraju dvije varijante, od kojih je jedna uvijek degradirana putem NMD (Stauffer i sur. 2010). Varijante AtPTB1 i AtPTB2 su rezultat negativne auto- i unakrsne regulacije, što je u skladu s njihovim ortolozima u ljudi. U transgeničnom uročnjaku promjena u ekspresiji ovih proteina ima utjecaj na obrasce prekrajanja brojnih transkripata uključenih u razvojne procese, dok za AtPTB3 to nije slučaj (Rühl i sur. 2012).

U viših biljaka postoji i obitelj malih proteina s N-terminalnim motivom prepoznavanja RNA i regijom bogatom glicinom na C-terminalnom kraju koji liče na proteine hnRNP (Mangeon i sur. 2010) i imaju ulogu u odgovoru na stres, a dva proteina iz te obitelji, AtGRP7 i AtGRP8, imaju ulogu u alternativnom prekrajanju. Kontrolira ih cirkadijani sat, a sudjeluju u sustavu cirkadijanog tempiranja (Carpenter i sur. 1994; Staiger i Heintzen 2009) i kontroliraju svoju ekspresiju auto-regulacijom vezanjem za vlastitu mRNA i recipročnom regulacijom stvarajući transkripte podložne putu NMD (Schöning i sur. 2008; Staiger i sur. 2003).

3. Alternativno prekrajanje i raznolikost proteina

Prvi opaženi slučaj alternativnog prekrajanja u biljaka bilo je alternativno prekrajanje pre-mRNA za aktivazu (RCA) ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco). Protein ima dvije izoforme različite dužine koje se razlikuju na C kraju kao rezultat biranja alternativnog 5' mjesta prekrajanja introna (Werneke i sur. 1989). RCA aktivira Rubisco hidrolizom ATP-a, ali je ta aktivnost inhibirana visokim omjerom ADP/ATP. Obje izoforme, duža RCA α i kraća RCA β , aktiviraju Rubisco, no duža izoforma je osjetljivija na inhibiciju ADP-om zbog strukturnih razlika u C-terminalnom kraju (Zhang i Portis 1999).

Alternativnim prekrajanjem mijenja se sekvenca u transkriptu, što utječe na ekspresiju gena na više razina. Osim što se alternativno prekrojene mRNA mogu razlikovati u stabilnosti i sudbini transkripta, one generiraju različite izoforme proteina koje mogu imati različite funkcije i djelovati u različitim dijelovima stanice (Reddy i sur. 2013). Jedan od primjera za kontrolu lokalizacije alternativnim prekrajanjem je gen RAD52-1, koji sudjeluje u popravku dvolančanih lomova osnovanom na homologiji i kodira za dvije izoforme, od kojih jedna ima zadržan zadnji intron i lokalizirana je u nukleoplazmi, dok je druga izoforma lokalizirana u mitohondriju. Produkti gena RAD52-2 su također sadržani u različitim dijelovima stanice: jedan u kloroplastu i nukleoplazmi, a drugi isključivo u kloroplastu (Kashkan i sur. 2022). Gen YUCCA 4 kodira za faktor uključen u biosintezu auksina, a stvara dvije izoforme. YUC4.1 je protein pune dužine lokaliziran u citosolu, dok je YUC4.2 protein kodiran transkriptom u kojem je zadržan posljednji intron čime nastaje transmembranska domena zbog koje je YUC4.2 lokaliziran na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma, a osim toga ta izoforma je specifična za cvjetove. Metaboličku aktivnost uzvodno od proteina YUCCA 4 ima triptofan aminotransferaza TAA1 i njen paralog TAR2, a djeluju u citosolu, odnosno endoplazmatskom retikulumu. Ovi proteini djeluju zajedno s izoformama YUCCA 4 u specifičnim dijelovima stanice i njihova domena djelovanja se ne preklapa, što ukazuje na neovisnost izoformi jedne o drugoj (Kashkan i sur. 2022; Kriechbaumer i sur. 2017).

Osim gena čije alternativne varijante djeluju međusobno neovisno, postoje i oni čije izoforme direktno utječu jedna na drugu. Dulja izoforma proteina BES1, uključena u signaliziranje brasinosteroida, sadrži dva signala jezgrine signalizacije i prenosi se u jezgri, a kraća, s alternativnim početnim kodonom zbog kojeg jedan od signala nedostaje, postoji i u jezgri i u citoplazmi. Kad su ove dvije izoforme eksprimirane zajedno, kraća se nalazi samo u jezgri jer dimerizira s dužom, što je primjer kontrole lokalizacije jedne izoforme drugom (Jiang i sur. 2015).

Krnje izoforme proteina nastale kao rezultat alternativnog prekrajanja koje uzrokuje pomak okvira čitanja mogu i dalje sadržavati funkcionalne domene, no one mogu i izostajati. Veliki broj transkripcijskih faktora i regulatora prekrajanja su modularni proteini, što znači da neki krnji rezultati alternativnog prekrajanja njihovih transkripata mogu i dalje obavljati dio funkcija i djelovati kao dominantni negativni regulatori (Reddy i sur. 2013). Jedan od primjera su proteini koji čine homo- ili heterodimere, gdje krnji peptidi dobiveni alternativnim prekrajanjem mogu stvarati dimere i konkuriraju nativnim dimerima, ali nisu funkcionalni (Seo i sur. 2013; Staudt i Wenkel 2011). Transkripcijski faktor CCA1 osim proteina pune duljine

(CCA1 α) pojavljuje se u obliku proteina bez domene koja veže DNA (CCA1 β) i onemogućuje homodimerizaciju CCA1 α , koji zato gubi mogućnost vezanja za promotore (Seo i sur. 2011).

Izoforme nekih gena djeluju kooperativno. Jedan od primjera za kooperativno djelovanje je ranije spomenut RCA. Kraća izoforma, RCA β , je manje osjetljiva na fluktuacije u razini ADP-a zbog nedostatka cisteinskih bočnih ogranaka uključenih u njihovu percepciju. Na taj način aktivaza djeluje i u uvjetima slabijeg intenziteta svjetlosti kada je razina ATP-a niža, a zajedničko djelovanje izoformi omogućuje adaptaciju na različite intenzitete svjetlosti (Carvalho i sur. 2013; Zhang i Portis 1999).

Veliki broj introna biljaka i životinja sadrži uzastopne sekvence za 3' mjesto prekrajanja (NAGNAG, gdje je N bilo koji nukleotid), a alternativno prekrajanje na ovim mjestima ne uzrokuje pomak okvira čitanja i generira izoforme proteina s insercijom ili delecijom jednog proteina. U uročnjaka skoro 7000 introna sadrži ove uzastopne sekvence i njihovo alternativno prekrajanje je specifično regulirano u različitim organima i uvjetima (Iida i sur. 2008; Reddy i sur. 2013). Tako, na primjer, alternativnim prekrajanjem na uzastopnim sekvencama mRNA za protein ZIFL1 nastaju dvije izoforme s razlikom u dva nukleotida, od kojih jedna kodira za protein koji sudjeluje u procesima reguliranim auksinom, a druga za krnji protein koji ima funkciju u toleranciji suše i lokaliziran je na membrani tonoplasta (Remy i sur. 2013).

4. Evolucija prekrajanja

Evolucija alternativnog prekrajanja u biljaka, za razliku od iste u kralješnjaka, nije razriješena. Iz analize alternativnog prekrajanja u kralješnjaka koje je najkompleksnije u ljudi i postaje manje kompleksno što je vrsta evolucijski udaljenija od primata može se zaključiti da alternativno prekrajanje doprinosi specijaciji. Slučajevi alternativnog prekrajanja nisu vrlo evolucijski konzervirani i pretpostavlja se da alternativno prekrajanje specifično za određen rod ima ulogu u divergenciji fenotipa i funkcija organa (Barbosa-Morais i sur. 2012). Međutim, postoje i slučajevi preskakanja identičnih egzona koji su evolucijski konzervirani u životinja, biljaka i gljiva, što znači da su očuvani više od milijarde godina (Awan i sur. 2013). U srodnih vrsta alternativno prekrajanje koje uzrokuje pojavu preuranjenog stop kodona je konzerviranije od ostalih slučajeva prekrajanja (Ling i sur. 2019). Alternativno prekrajanje i genska ekspresija pokazuju obrasce koji su specifični za vrstu, a uspoređivanjem transkriptoma srodnih vrsta, Ling i sur. (2019) su ustanovili da su ekspresijski profili istih tkiva u srodnim vrstama sličniji

od profila različitih tkiva u jednoj vrsti. Iz toga se može zaključiti da vrsno-specifične grupe obrazaca alternativnog prekrajanja nisu rezultat razlike u ekspresiji gena.

Iako sami obrasci alternativnog prekrajanja nisu veoma evolucijski konzervirani, mehanizmi uključeni u alternativno prekrajanje u biljaka jesu. Determinante koje određuju konstitutivno i alternativno prekrajanje kao što su međusobna udaljenost alternativnih mjesta prekrajanja kao i udaljenost konstitutivnog mjesta prekrajanja od najbližeg unutrašnjeg slijeda GT/AG nalaze se u intronima. Sekvence unutar introna podložnije su divergenciji od egzonskih sekvenci, što doprinosi nastajanju obrazaca alternativnog prekrajanja specifičnih za vrstu. Još jedan element koji utječe na konzerviranost alternativnih mjesta prekrajanja među vrstama su transpozoni o čijem broju insercija ovise vrsno-specifični obrasci prekrajanja. Osim toga, moguće je da utjecaj na divergencije u alternativnom prekrajanju među vrstama imaju i razlike u *trans-*djelujućim faktorima kao što su proteini SR (Ling i sur. 2019).

Proteini SR su važni faktori u alternativnom prekrajanju u svim organizmima, i zato je očekivano da su obrasci alternativnog prekrajanja njihovih transkripata visoko konzervirani tokom evolucije. Iida i Go (2006) su identificirali tri slučaja alternativnog prekrajanja evolucijski konzerviranih i u jednosupnica i u dvosupnica. Alternativno prekrojani introni nalazili su se na sličnim pozicijama u više vrsta, što podržava pretpostavku o njihovom održanju kroz evoluciju. Ono što je variralo među vrstama je oblik alternativnog prekrajanja, no svi slučajevi su rezultirali proteinima s oslabljenim motivima prepoznavanja RNA. Postoji mogućnost da su ovi slučajevi alternativnog prekrajanja različitog podrijetla, ali je njihova pojava u više vrsta rezultat istog selektivnog pritiska (Iida i Go 2006).

Još jedan važan mehanizam koji je doveo do proširenja proteoma je duplikacija genoma. Odnos između alternativnog prekrajanja i duplikacije genoma još nije razriješen. Postoji nekoliko modela koji pokušavaju objasniti njihovu povezanost. Neovisni model predviđa da veličina genoma i alternativno prekrajanje nisu povezani, dok model dijeljena funkcija pretpostavlja da je između njih obrnuta korelacija. Treći, najnoviji model, predviđa da alternativno prekrajanje postaje češće u većim porodicama gena, a rjeđe u malim u usporedbi s jednim genom (Jin i sur. 2008; Su i sur. 2006). Duplikacija gena koji se alternativno prekraja može imati jedan od dva ishoda. Jedna mogućnost je da nastanu nove izoforme, a druga je da se neke izoforme izgube jer su redundantne, a većina promjena se dogodi brzo nakon duplikacije (Su i sur. 2006).

5. Funkcije alternativnog prekrajanja u razvoju biljaka i stresu

Alternativno prekrajanje ima važne uloge u razvoju biljaka i u odgovoru biljke na abiotički i biotički stres.

5.1. Alternativno prekrajanje tijekom razvoja biljaka

Period ranog razvoja biljke ključan je u uspostavi osnovnog uzorka rasta biljke, diferencijaciji u tkiva i inicijaciji reproduktivne faze. Embriogeneza se zygota razvija u zreli embrio jasno reguliranim procesom, nakon čega slijedi sazrijevanje sjemena koje uključuje nakupljanje hranjivih tvari i indukciju dormancije dok se sjeme ne nađe u uvjetima idealnim za klijanje (Szakonyi i Duque 2018).

Postoji veliki broj istraživanja koja se bave ekspresijom gena i uzorcima alternativnog prekrajanja tijekom ranog razvoja biljke. Važno je napomenuti da geni čiji transkripti prolaze kroz alternativno prekrajanje nisu nužno diferencijalno eksprimirani u različitim fazama razvoja, što ukazuje na to da su alternativno prekrajanje i regulacija transkripcije odvojeni procesi koji mijenjaju transkriptom (Srinivasan i sur. 2016). Tijekom embriogeneze soje nastaje više od 200000 različitih transkripata sa manje od 50000 gena. Većina alternativnog prekrajanja detektirana je tijekom kasnijih faza embriogeneze, što bi moglo biti rezultat grupiranja prekrajanja s faktorima povezanih s apscizinskom kiselinom opaženim u kasnijem razvoju sjemena (Aghamirzaie i sur. 2013). U vrste *A. thaliana* razina transkripcije tijekom sazrijevanja opada, dok alternativno prekrajanje postaje češće, i više od četvrtine lokusa podvrnutih alternativnom prekrajanju daje izoforme specifične za određene faze (Srinivasan i sur. 2016). Za indukciju klijanja potrebna je ekspresija točno određenih gena, a alternativno prekrajanje sudjeluje u tome te su u to vrijeme regulatori prekrajanja njegova najznačajnija meta. Pretjerana ekspresija gena i ukinuće funkcije prekrajanja vodi do letalnosti, a promjena u ekspresiji faktora prekrajanja može uzrokovati defekte u razvoju klijanaca, kao što je abnormalna distribucija auksina (Szakonyi i Duque 2018).

Alternativno prekrajanje ima ulogu u početnom odgovoru etioliranih klijanaca na izlaganje crvenom svjetlu. U tom slučaju se pojačano aktiviraju geni uključeni u prekrajanje, kao što su geni koji kodiraju proteine SR i podjedinice spliceosoma U1 i U2. Osim toga, pokazano je da je alternativno prekrajanje uključeno u diferencijaciju kloroplasta potaknutu svjetlom (Shikata i sur. 2014) te jer otkrivena povezanost alternativnog prekrajanja potaknutog svjetlom i stabilnosti mRNA, budući da je više od tri četvrtine detektiranih izoformi potencijana meta puta NMD (Hartmann i sur. 2016). Mutante gena uključenih u procesiranje mRNA također pokazuju

promjene u dormanciji i klijanju sjemena, a te promjene se najviše odnose na signalni put apscizinske kiseline i prekrajanje i poliadenilaciju produkata gena *DOG1*, važnog regulatora dormancije i mete alternativnog prekrajanja (Cyrek i sur. 2016; Dolata i sur. 2015; Szakonyi i Duque 2018).

Ekspresija velikog broja izoformi mRNA je tkivno i razvojno specifična. Neke od tih izoformi gube funkciju (Wang i sur. 2018), a dio ju zadržava uz promjene u efikasnosti čak i kad nedostaju ključni sljedovi aminokiseline (Li i sur. 2017). Izoforme mogu imati slične ili različite funkcije ovisno o razvojnom stadiju. Tako na primjer konstitutivni i alternativni oblik mRNA *PIF6* slično djeluju u reakciji klijanaca na svjetlost, ali samo kraća izoforma ima ulogu i u klijanju (Penfield i sur. 2010). Pretjerana ekspresija nekih izoformi može interferirati s funkcijom konstitutivnog proteina (Zhou i sur. 1998), ali je za potpunu funkciju nekih proteina ekspresija više izoformi ključna. Koekspresija izoformi je važna za promoviranje dormancije na razini funkcije gena *DOG1*. Ukoliko je eksprimirana samo jedna izoforma proteina *DOG1*, dormancija sjemenke nije uspostavljena, ali u transgeničnim linijama s više izoformi je (Nakabayashi i sur. 2015).

Još jedan važna razvojna tranzicija u biljaka je prelazak s vegetativne u reproduktivnu fazu. U poticanje cvjetanja uključen je RNA vezujući protein *FCA* koji blokira ekspresiju represora cvjetanja *FLC*. *FCA* generira četiri različita transkripta, *FCA- α* , *FCA- β* , *FCA- δ* i *FCA- γ* , kroz alternativno prekrajanje i poliadenilaciju pre-mRNA (Macknight i sur. 1997; Simpson 2004). Te izoforme se javljaju u istom omjeru u svim tkivima i razvojnim stadijima, no mijenja im se značaj. Funkcionalni protein pune dužine kojeg kodira *FCA- γ* sadrži dva motiva prepoznavanja RNA i domenu za stvaranje interakcija protein-protein. Alternativnim prekrajanjem nastaju transkripti kojima nedostaju ove domene. Korištenjem alternativnih 3' i 5' mjesta prekrajanja u trinaestom intronu nastaje transkript *FCA- δ* bez domene za nterakcije protein-protein i 63 nizvodne aminokiseline, a retencijom trećeg introna nastaje transkript *FCA- α* s još jednim nizvodnim okvirom čitanja. Preuranjenim cijepanjem i poliadenilacijom unutar trećeg introna nastaje krnji transkript *FCA- β* , koji kodira za protein kojemu nedostaju sve navedene funkcionalne domene, no taj protein je najbrojniji u stanici (Macknight i sur. 1997). *FCA- β* nastaje negativnom autoregulacijom proteina *FCA- γ* na način da funkcionalni protein preferentno uzrokuje poliadenilaciju u trećem intronu i proizvodnju *FCA- β* pomoću aktivnosti svoje domene za protein-protein interakcije (Quesada i sur. 2003). Time se izbjegava pretjerana proizvodnja aktivne izoforme koja bi mogla uzrokovati preuranjeno cvjetanje (Carvalho i sur. 2013).

5.2. Alternativno prekrajanje i odgovor biljaka na stres

Alternativno prekrajanje pre-mRNA za transkripcijski faktor polimeraze III A (TFIIIA) ima ulogu u toleranciji na abiotički stres (Fu i sur. 2009). TFIIIA veže rDNA i rRNA 5S te posreduje transkripciji rRNA 5S, a komparativnom analizom sekvenci vrsta *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa* otkriven je konzervirani slučaj preskakanja egzona u tom genu. Dvije izoforme koje nastaju su transkript pune duljine (EI), koji sadrži preuranjeni stop kodon i meta je NMD puta i transkript u kojem je jedan egzon preskočen (ES). Linije uročnjaka s nadeksprimiranom izoformom EI ne pokazuju vidljivi fenotip, dok transgene linije s nadeksprimiranom izoformom ES pokazuju fenotipe kao što su niska tolerancija na visoku koncentraciju soli ili manitola, te se u njima više akumulira i izoforma EI. To ukazuje na moguću posttranskripcijsku regulaciju mehanizmom negativne povratne sprege. Egzon koji se u izoformi EI ne izrezuje sadrži element nalik rRNA 5S, čime se TFIIIA veže na vlastitu pre-mRNA i promovira uključivanje egzona koje vodi k degradaciji. U uvjetima visoke razine TFIIIA u stanici egzon ostaje u transkriptu, a u uvjetima niske razine egzon se izrezuje i nastaje aktivni TFIIIA. Na taj način se održava homeostaza TFIIIA u stanici koja je važna u uvjetima osmotskog stresa (Carvalho i sur. 2013; Fu i sur. 2009).

U odgovoru na biotički stres biljaka veliku važnost imaju geni za otpornost na bolesti (*R*, eng. *Resistance*) koji posreduju specifičnom prepoznavanju patogena nositelja determinanti srodne avirulencije (Gassmann 2008). Ti odgovori mogu nanijeti štetu biljci, zbog čega moraju biti čvrsto kontrolirani. Proteini kodirani *R* genima sadrže mjesto vezanje nukleotida (NBS, od eng. *nucleotide binding site*) i C-terminalni motiv ponavljanja bogatog leucinom (LRR, od eng. *Leucine-rich repeat*) izložen površini proteina, a veliki broj sadrži i N-terminalnu receptorsku domenu toll/interleukin-1 (TIR). Alternativnim prekrajanjem često nastaju transkripti koji kodiraju za krnje proteine TIR-NBS (Gassmann 2008). Gen *N* koji duhanu daje rezistenciju na virus mozaika duhana daje dvije izoforme, N_L nastalu retencijom alternativnog egzona unutar trećeg introna i N_S koja kodira za funkcionalni protein. Retencijom alternativnog egzona dolazi do promjene u okviru čitanja i pojave preuranjenog stop kodona zbog čega izostaje LRR domena. Za potpunu rezistenciju potrebne su obje izoforme, a važan je i njihov omjer koji se mijenja tijekom reakcije na virusne signale (Dinesh-Kumar i Baker 2000). Gen *RPS4* uročnjaku omogućuje rezistenciju na određene sojeve bakterije *Pseudomonas syringae*, a generira nekoliko izoformi s različitim brojem domena ponavljanja bogatih leucinom. Kao i u slučaju gena *N*, omjer ovih izoformi je važan u rezistenciji na bakteriju, a svaka od izoformi ima svoji funkciju te one djeluju zajedno u pripremi stanice na odgovor rezistencije (Zhang i Gassmann

2007). Iako se zna da alternativno prekrajanje ima ulogu u rezistenciji biljaka na patogene, točan mehanizam kojim se ona postiže još nije poznat (Carvalho i sur. 2013).

6. Alati za identifikaciju prekrajanja

Razvoj tehnika sekvenciranja RNA nove generacije (RNAseq) i tehnologije oligonukleotidnih mikročipova velikih razmjera omogućio je bolji pogled na kompleksnost transkriptoma. Za analizu pomoću mikročipa potrebno je već poznavati alternativno prekrojene varijante, dok se pomoću RNAseq mogu identificirati transkripti bez prethodnog znanja. Veliki problem u sekvenciranju transkriptoma biljaka predstavlja veliki udio malog broja jako eksprimiranih gena, što otežava analizu slabije eksprimiranih gena. Četvrtinu svih transkripata u stanici čine produkti transkripcije samo deset gena uključenih u proces fotosinteze (Weber i sur. 2007). Bolja pokrivenost transkriptoma postiže se dubljim sekvenciranjem s više čitanja. Alternativno prekrajanje se može proučavati usklađivanjem sljedova komplementarne DNA (cDNA) s genomskim sljedovima, čime se pronalaze izoforme koje potječu od iste sekvence u genomu. Alternativno prekrajanje se na taj način može identificirati računskim metodama, no postoje neka ograničenja, uključujući pristranost prema krajevima transkripta, nedovoljan broj sekvenci, lošu reprezentaciju nekih izoformi i nemogućnost uzorkovanja tkivno ili uvjetno ovisnih transkripata. Korištenjem oligonukleotidnih mikročipova s probama koje hibridiziraju s konstitutivnim ili alternativnim egzonima (Hu i sur. 2001) ili probama koje vežu spoj dva egzona (Johnson i sur. 2003) ti problemi se mogu izbjeći, no za njih je potrebno već poznavati strukturu introna i egzona. Specifične mRNA koje interagiraju s određenim proteinima uključenim u prekrajanje mogu se analizirati kombinacijom mikročipova s metodom unakrsnog povezivanja RNA i proteina spregnutog s imunoprecipitacijom (Barbazuk i sur. 2008).

Posljednjih godina razvijeno je nekoliko alata za predviđanje prekrajanja koji poravnavaju sekvence i detektiraju granice između introna i egzona. Većina programa bazirano je na predviđanju pomoću referentnog genoma i koriste jednu od dvije glavne strategije. Prvom strategijom, pristupom „*exon-first*“, sekvence mRNA se usklade s genomom, a zatim se ostatak sekvenci koje nisu usklađene režu i ponovno usklađuju. Druga strategija je takozvana metoda ekstenzije klice (eng. *seed extend*) koja podrazumijeva cijepanje očitavanja i ekstenziju klice uzvodno i nizvodno (Garber i sur. 2011). Samo mali broj dostupnih programa omogućuje predikciju transkriptoma neovisno o genomu. Neki od programa za predikciju alternativnog prekrajanja su: Trinity, Tophat, QPALMA, Splicemap i AGUSTUS (Barbazuk i sur. 2008; Reddy i sur. 2013).

Cijepanjem očitavanja u kraće sekvence kako bi se mogli uskladiti s genomom djelomično se gubi jedinstvenost njihove lokacije u genomu, čime se dobiva veliki broj lažno pozitivnih rezultata. Kako bi se to izbjeglo, koriste se sekvenciranje parova krajeva, jer omogućuje procjenu minimalne i maksimalne udaljenosti između sparenih očitavanja što olakšava usklađivanje sekvenci (Reddy i sur. 2013).

7. Zaključak i perspektive

Unatoč tome što je znanje o alternativnom prekrajanju u biljaka još uvijek limitirano, može se zaključiti da ono ima ključnu ulogu u razvoju i fiziološkim procesima biljaka te da je rasprostranjenije nego što se prije mislilo. Ishodi alternativnog prekrajanja mogu biti razni, od mRNA s preuranjenim stop kodonom koja se degradira, proteina uključenih u iste procese u različitim mjestima u stanici, proteina koji se međusobno reguliraju, pa sve do proteina s potpuno različitim funkcijama. Osnovni mehanizam alternativnog prekrajanja u biljaka i životinja je sličan, no postoje bitne razlike u prepoznavanju i selekciji introna. Veliki problem čini dostupnost samo malog broja sekvenciranih transkriptoma. Točna struktura spliceosoma biljaka još je neistražena, kao i potpuna funkcija proteina regulatora prekrajanja u procesiranju mRNA i ekspresiji gena. Za veliki broj poznatih slučajeva alternativnog prekrajanja zna se samo u kojim procesima sudjeluju, ali ne i mehanizmi njihove pojave i djelovanja. Veliki dio razumijevanja alternativnog prekrajanja u biljaka bazira se na pronalaženju ortologa poznatih gena u životinja. Buduća istraživanja trebala bi biti olakšana razvojem tehnika sekvenciranja RNA nove generacije i programa za predviđanje prekrajanja, kao i sekvenciranjem većeg broja transkriptoma u različitim vrstama i u različitim tkivima iste vrste.

Literatura

- Aghamirzaie D., Nabiyouni M., Fang Y., Klumas C., Heath L.S., Grene R., Collakova E. (2013): Changes in RNA Splicing in Developing Soybean (*Glycine max*) Embryos. *Biology (Basel)* **2**: 1311–1337.
- Awan A.R., Manfredo A., Pleiss J.A. (2013): Lariat sequencing in a unicellular yeast identifies regulated alternative splicing of exons that are evolutionarily conserved with humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 12762–12767.
- Barash Y., Calarco J.A., Gao W., Pan Q., Wang X., Shai O., Blencowe B.J., Frey B.J. (2010): Deciphering the splicing code. *Nature* 2010 465:7294 **465**: 53–59.

- Barbazuk W.B., Fu Y., McGinnis K.M. (2008): Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: opportunities and challenges. *Genome Res* **18**: 1382–1391.
- Barbosa-Morais N.L., Irimia M., Pan Q., Xiong H.Y., Gueroussov S., Lee L.J., Slobodeniuc V., Kutter C., Watt S., Çolak R., Kim T.H., Misquitta-Ali C.M., Wilson M.D., Kim P.M., Odom D.T., Frey B.J., Blencowe B.J. (2012): The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science* (1979) **338**: 1587–1593.
- Barta A., Kalyna M., Reddy A.S.N. (2010): Implementing a Rational and Consistent Nomenclature for Serine/Arginine-Rich Protein Splicing Factors (SR Proteins) in Plants. *Plant Cell* **22**: 2926–2929.
- Carpenter C.D., Kreps J.A., Simon A.E. (1994): Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol* **104**: 1015–1025.
- Carvalho R.F., Feijão C. V., Duque P. (2013): On the physiological significance of alternative splicing events in higher plants. *Protoplasma* **250**: 639–650.
- Chasin L.A. (2007): Searching for Splicing Motifs. *Adv Exp Med Biol* **623**: 85–106.
- Cyrek M., Fedak H., Ciesielski A., Guo Y., Sliwa A., Brzeźniak L., Krzyczmonik K., Pietras Z., Kaczanowski S., Liu F., Swiezewski S. (2016): Seed Dormancy in *Arabidopsis* Is Controlled by Alternative Polyadenylation of DOG1. *Plant Physiol* **170**: 947–955.
- Dinesh-Kumar S.P., Baker B.J. (2000): Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1908–1913.
- Dolata J., Guo Y., Kołowerzo A., Smoliński D., Brzyżek G., Jarmołowski A., Świeżewski S. (2015): NTR1 is required for transcription elongation checkpoints at alternative exons in *Arabidopsis*. *EMBO J* **34**: 544–558.
- Fu Y., Bannach O., Chen H., Teune J.H., Schmitz A., Steger G., Xiong L., Barbazuk W.B. (2009): Alternative splicing of anciently exonized 5S rRNA regulates plant transcription factor TFIIIA. *Genome Res* **19**: 913–921.
- Garber M., Grabherr M.G., Guttman M., Trapnell C. (2011): Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods* **8**: 469–477.

- Gassmann W. (2008): Alternative splicing in plant defense. *Curr Top Microbiol Immunol* **326**: 219–233.
- Gehring N.H., Roignant J.Y. (2021): Anything but Ordinary – Emerging Splicing Mechanisms in Eukaryotic Gene Regulation. *Trends in Genetics* **37**: 355–372.
- GeneInfinity (2023) http://www.geneinfinity.org/sp/sp_coding.html
- Girard C., Will C.L., Peng J., Makarov E.M., Kastner B., Lemm I., Urlaub H., Hartmuth K., Luhrmann R. (2012): Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. *Nat Commun* **3**: 994.
- Goodall G.J., Filipowicz W. (1991): Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. *EMBO J* **10**: 2635–2644.
- Hartmann L., Drewe-Boß P., Wießner T., Wagner G., Geue S., Lee H.C., Obermüller D.M., Kahles A., Behr J., Sinz F.H., Rättsch G., Wachter A. (2016): Alternative Splicing Substantially Diversifies the Transcriptome during Early Photomorphogenesis and Correlates with the Energy Availability in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**: 2715–2734.
- Hu G.K., Madore S.J., Moldover B., Jatko T., Balaban D., Thomas J., Wang Y. (2001): Predicting Splice Variant from DNA Chip Expression Data. *Genome Res* **11**: 1237–1245.
- Iida K., Go M. (2006): Survey of conserved alternative splicing events of mRNAs encoding SR proteins in land plants. *Mol Biol Evol* **23**: 1085–1094.
- Iida K., Shionyu M., Suso Y. (2008): Alternative Splicing at NAGNAG Acceptor Sites Shares Common Properties in Land Plants and Mammals. *Mol Biol Evol* **25**: 709–718.
- Jiang J., Zhang C., Wang X. (2015): A Recently Evolved Isoform of the Transcription Factor BES1 Promotes Brassinosteroid Signaling and Development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **27**: 361–374.
- Jin L., Kryukov K., Clemente J.C., Komiyama T., Suzuki Y., Imanishi T., Ikeo K., Gojobori T. (2008): The evolutionary relationship between gene duplication and alternative splicing. *Gene* **427**: 19–31.
- Johnson J.M., Castle J., Garrett-Engle P., Kan Z., Loerch P.M., Armour C.D., Santos R., Schadt E.E., Stoughton R., Shoemaker D.D. (2003): Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays. *Science* (1979) **302**: 2141–2144.

- Kashkan I., Timofeyenko K., Růžička K. (2022): How alternative splicing changes the properties of plant proteins. *Quantitative Plant Biology* **3**: e14.
- Kertész S., Kerényi Z., Mérai Z., Bartos I., Pálffy T., Barta E., Silhavy D. (2006): Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Res* **34**: 6147–6157.
- Kriechbaumer V., Botchway S.W., Hawes C. (2017): Localization and interactions between Arabidopsis auxin biosynthetic enzymes in the TAA/YUC-dependent pathway. *J Exp Bot* **68**: 4195–4207.
- Ladd A.N., Cooper T.A. (2002): Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome Biol* **3**: reviews0008.1.
- Lambert D., Draper D.E. (2007): Effects of Osmolytes on RNA Secondary and Tertiary Structure Stabilities and RNA-Mg²⁺ Interactions. *J Mol Biol* **370**: 993–1005.
- Li C., Zheng L., Zhang J., Lv Y., Liu J., Wang X., Palfalvi G., Wang G., Zhang Y. (2017): Characterization and functional analysis of four HYH splicing variants in Arabidopsis hypocotyl elongation. *Gene* **619**: 44–49.
- Lim L.P., Burge C.B. (2001): A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11193–11198.
- Ling Z., Brockmüller T., Baldwin I.T., Xu S. (2019): Evolution of alternative splicing in eudicots. *Front Plant Sci* **10**: 707.
- Liu H.X., Goodall G.J., Kole R., Filipowicz W. (1995): Effects of secondary structure on pre-mRNA splicing: hairpins sequestering the 5' but not the 3' splice site inhibit intron processing in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J* **14**: 377–388.
- Lopato S., Gattoni R., Fabini G., Stevenin J., Barta A. (1999a): A novel family of plant splicing factors with a Zn knuckle motif: Examination of RNA binding and splicing activities. *Plant Mol Biol* **39**: 761–773.
- Lopato S., Kalyna M., Dorner S., Kobayashi R., Krainer A.R., Barta A. (1999b): atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev* **13**: 987–1001.

- Lorković Z.J. (2009): Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci* **14**: 229–236.
- Lykke-Andersen J., Shu M.D., Steitz J.A. (2001): Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* (1979) **293**: 1836–1839.
- Macknight R., Bancroft I., Page T., Lister C., Schmidt R., Love K., Westphal L., Murphy G., Sherson S., Cobbett C., Dean C. (1997): FCA, a gene controlling flowering time in arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**: 737–745.
- Mangeon A., Junqueira R.M., Sachetto-Martins G. (2010): Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav* **5**: 99–104.
- McManus C.J., Graveley B.R. (2011): RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr Opin Genet Dev* **21**: 373–379.
- Meyer K., Koester T., Staiger D. (2015): Pre-mRNA Splicing in Plants: In Vivo Functions of RNA-Binding Proteins Implicated in the Splicing Process. *Biomolecules* **5**: 1717.
- Mullen M.A., Assmann S.M., Bevilacqua P.C. (2012): Toward a digital gene response: RNA G-quadruplexes with fewer quartets fold with higher cooperativity. *J Am Chem Soc* **134**: 812–815.
- Nakabayashi K., Bartsch M., Ding J., Soppe W.J.J. (2015): Seed Dormancy in Arabidopsis Requires Self-Binding Ability of DOG1 Protein and the Presence of Multiple Isoforms Generated by Alternative Splicing. *PLoS Genet* **11**: e1005737.
- Nyikó T., Sonkoly B., Mérai Z., Benkovics A.H., Silhavy D. (2009): Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Mol Biol* **71**: 367–378.
- Palusa S.G., Reddy A.S.N. (2010): Extensive coupling of alternative splicing of pre-mRNAs of serine/arginine (SR) genes with nonsense-mediated decay. *New Phytologist* **185**: 83–89.
- Penfield S., Josse E.M., Halliday K.J. (2010): A role for an alternative splice variant of PIF6 in the control of Arabidopsis primary seed dormancy. *Plant Mol Biol* **73**: 89–95.
- Quesada V., Macknight R., Dean C., Simpson G.G. (2003): Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time. *EMBO J* **22**: 3142–3152.

- Reddy A.S.N., Marquez Y., Kalyna M., Barta A. (2013): Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants. *Plant Cell* **25**: 3657–3683.
- Reddy A.S.N., Rogers M.F., Richardson D.N., Hamilton M., Ben-Hur A. (2012): Deciphering the plant splicing code: Experimental and computational approaches for predicting alternative splicing and splicing regulatory elements. *Front Plant Sci* **3**: 18.
- Remy E., Cabrito T.R., Baster P., Batista R.A., Teixeira M.C., Friml J., Sá-Correia I., Duque P. (2013): A Major Facilitator Superfamily Transporter Plays a Dual Role in Polar Auxin Transport and Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 901–926.
- Richardson D.N., Rogers M.F., Labadorf A., Ben-Hur A., Guo H., Paterson A.H., Reddy A.S.N. (2011): Comparative analysis of serine/arginine-rich proteins across 27 eukaryotes: Insights into sub-family classification and extent of alternative splicing. *PLoS One* **6**: e24542.
- Rühl C., Stauffer E., Kahles A., Wagner G., Drechsel G., Rättsch G., Wachter A. (2012): Polypyrimidine Tract Binding Protein Homologs from *Arabidopsis* Are Key Regulators of Alternative Splicing with Implications in Fundamental Developmental Processes. *Plant Cell* **24**: 4360–4375.
- Schöning J.C., Streitner C., Meyer I.M., Gao Y., Staiger D. (2008): Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* **36**: 6977–6987.
- Seo P.J., Hong S.Y., Kim S.G., Park C.M. (2011): Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends Plant Sci* **16**: 541–549.
- Seo P.J., Park M.J., Park C.M. (2013): Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: mechanisms and functions. *Planta* **237**: 1415–1424.
- Shikata H., Hanada K., Ushijima T., Nakashima M., Suzuki Y., Matsushita T. (2014): Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 18781–18786.
- Silverman I.M., Li F., Gregory B.D. (2013): Genomic era analyses of RNA secondary structure and RNA-binding proteins reveal their significance to post-transcriptional regulation in plants. *Plant Science* **205–206**: 55–62.
- Simpson G.G. (2004): The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 570–574.

- Srinivasan A., Jiménez-Gómez J.M., Fornara F., Soppe W.J.J., Brambilla V. (2016): Alternative splicing enhances transcriptome complexity in desiccating seeds. *J Integr Plant Biol* **58**: 947–958.
- Staiger D., Heintzen C. (2009): The Circadian System of *Arabidopsis thaliana*: Forward and Reverse Genetic Approaches. <http://dx.doi.org/10.3109/07420529908998708> **16**: 1–16.
- Staiger D., Zecca L., Wiczyk Kirk D.A., Apel K., Eckstein L. (2003): The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant Journal* **33**: 361–371.
- Staudt A.C., Wenkel S. (2011): Regulation of protein function by “microProteins.” *EMBO Rep* **12**: 35–42.
- Stauffer E., Westermann A., Wagner G., Wachter A. (2010): Polypyrimidine tract-binding protein homologues from *Arabidopsis* underlie regulatory circuits based on alternative splicing and downstream control. *Plant Journal* **64**: 243–255.
- Su Z., Wang J., Yu J., Huang X., Gu X. (2006): Evolution of alternative splicing after gene duplication. *Genome Res* **16**: 182–189.
- Szakonyi D., Duque P. (2018): Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Front Plant Sci* **9**: 1174.
- Wachter A., Rühl C., Stauffer E. (2012): The Role of Polypyrimidine Tract-Binding Proteins and Other hnRNP Proteins in Plant Splicing Regulation. *Front Plant Sci* **3**: 81.
- Wang B.B., Brendel V. (2004): The ASRG database: identification and survey of *Arabidopsis thaliana* genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biol* **5**: R102.
- Wang Y., Zhang T., Song X., Zhang J., Dang Z., Pei X., Long Y. (2018): Identification and functional analysis of two alternatively spliced transcripts of ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) in linseed flax (*Linum usitatissimum* L.). *PLoS One* **13**: e0191910.
- Weber A.P.M., Weber K.L., Carr K., Wilkerson C., Ohlrogge J.B. (2007): Sampling the *Arabidopsis* Transcriptome with Massively Parallel Pyrosequencing. *Plant Physiol* **144**: 32–42.
- Werneke J.M., Chatfield J.M., Ogren W.L. (1989): Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**: 815–825.

- Wiebauer K., Herrero J.J., Filipowicz W. (1988): Nuclear pre-mRNA processing in plants: distinct modes of 3'-splice-site selection in plants and animals. *Mol Cell Biol* **8**: 2042–2051.
- Zhang N., Portis A.R. (1999): Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9438–9443.
- Zhang X.C., Gassmann W. (2007): Alternative Splicing and mRNA Levels of the Disease Resistance Gene RPS4 Are Induced during Defense Responses. *Plant Physiol* **145**: 1577–1587.
- Zhang X.N., Mount S.M. (2009): Two alternatively spliced isoforms of the Arabidopsis SR45 protein have distinct roles during normal plant development. *Plant Physiol* **150**: 1450–1458.
- Zhou D.X., Kim Y.J., Li Y.F., Carol P., Mache R. (1998): COP1b, an isoform of COP1 generated by alternative splicing, has a negative effect on COP1 function in regulating light-dependent seedling development in Arabidopsis. *Molecular and General Genetics* **257**: 387–391.

Životopis

Moje je ime Iva Marković. Rođena sam u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Vinka Žganca i Petu gimnaziju. U osnovnoj i srednjoj školi me najviše zanimala biologija, zbog čega sam u srednjoj školi tri puta pohađala ljetnu školu znanosti u sklopu Znanstveno edukacijskog centra Višnjan. Tamo sam i odlučila da želim studirati molekularnu biologiju te sam 2020. godine upisala preddiplomski studij Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija me najviše zainteresirala genetika, botanika i mikologija. Za vrijeme preddiplomskog studija uključila sam se u rad Udruge studenata biologije (BIUS) u sklopu koje sam sa sekcijom za gljive sudjelovala na velikom terenu Histria 2022. U slobodno vrijeme učim strane jezike i 2020. godine sam položila DSD ispit iz njemačkog jezika s C1, a 2022. ispit iz engleskog jezika IELTS s ocjenom 8,5, a osim toga učila sam španjolski i nizozemski jezik.