

Posttranskripcijske modifikacije tRNA

Babić, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:479711>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Luka Babić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Posttranskripcijske modifikacije tRNA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

3. rujna 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Table of Contents

§ SAŽETAK.....	6
§ 1. UVOD.....	7
1.1. Struktura i funkcija tRNA	8
§ 2. POSTTRANSKRIPCIJSKE MODIFIKACIJE.....	10
2.1. Izrezivanje introna	11
2.2. Modifikacije 3' i 5' kraja	14
2.3. Modifikacije nukleotida tRNA i njihove funkcije	16
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	29

§ Sažetak

tRNA je jedan od ključnih igrača translacije jer dovodi aminokiseline do ribosoma kako bi ih se prenijelo na rastući polipeptidni lanac. Kako bi tRNA mogla efikasno i vjerno obaviti svoju dužnost transporta aminokiselina, nije ju dovoljno samo transkribirati iz gena, već je na prekursorskoj tRNA potrebno izvršiti niz preinaka koje nazivamo posttranskripcijskim modifikacijama.

Posttranskripcijske modifikacije uključuju izrezivanje introna, doradu 3' i 5' kraja i modifikacije nukleotida. Izrezivanje introna kod tRNA je specifično i razlikuje se značajno od spliceosomskog izrezivanja i samoizrezivanja kod mRNA. Modifikacija 5' kraja događa se uz pomoć ribonukleoproteinskog kompleksa RNaze P koja je prisutna kod svih organizama, ali se proteinski sadržaj razlikuje značajno između bakterija, arheja i eukariota. 3' kraj se procesira pomoću tRNA-nukleotidil transferaza koje bez kalupa dodaju trinukleotid CCA koji pak je neophodan za vezanje aminokiseline tijekom procesa translacije.

Nukleotidne modifikacije tRNA su najbrojnije i gotovo ih je 10 puta više kod tRNA nego kod drugih bioloških RNA, a ukupno ih je pronađeno više od 150 kroz sve tri domene života. Modifikacije specijaliziraju pojedine molekule tRNA za razne funkcije i odgovor na vanjske podražaje. Najčešće su to vrlo jednostavne kemijske promjene koje imaju veliki utjecaj na sparivanje baza u tRNA pa su samim time i ključne su za stabilnost, smatanje, dekodiranje i aminoacilaciju. Najčešće nukleotidne modifikacije uključuju metilacije, deaminacije i tiolacije. Izostanak mnogih nukleotidnih modifikacija ili gena koji kodiraju za modifikacijske enzime u organizmu vrlo često je fatalno ili uzrokuje snažne metaboličke poremećaje.

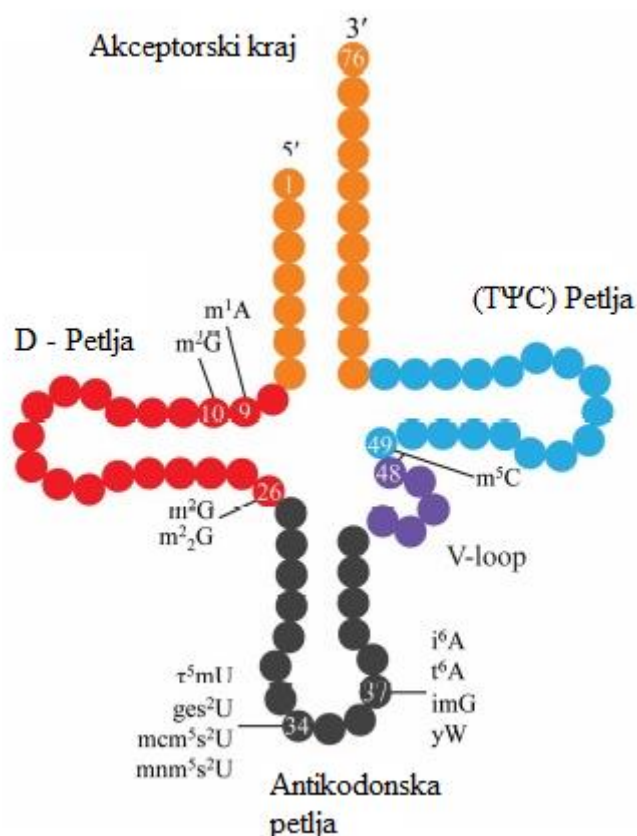
§ 1. UVOD

DNA je nositeljica genetske upute, ali genetske upute za sintezu proteina ne eksprimiraju se direktno iz DNA. Kako bi došlo do ekspresije gena pohranjenih u njoj ključna su dva procesa: transkripcija i translacija. U procesu transkripcije DNA se prema kalupu uz pomoć RNA-polimeraze II prepisuje u glasničku RNA ili mRNA. mRNA nastala transkripcijom se doraduje do zrele mRNA koja je spremna vezati se na ribosom na kojem se događa biosinteza proteina ili translacija. Proteini imaju ključne uloge u životu svih stanica, a najistaknutije su građivna i katalitička (enzimi). Kako bi se proteini mogli sintetizirati potrebne su nam njihove građevne jedinice – aminokiseline. Po tri baze mRNA kodiraju za jednu aminokiselinu što nazivamo kodonom s kojim se sparuju 3 komplementarne baze antikodona prijenosne RNA ili tRNA.

Glavna uloga tRNA je dopremanje odgovarajuće aminokiseline na ribosom tijekom translacije, a kako bi svoju zadaću mogla obaviti njezin 3' kraj mora se aminoacilirati pomoću aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Pravilno sparivanje kodona i antikodona pravilno aminoacilirane tRNA ključno je za točnost translacije, odnosno za prijenos ispravne aminokiseline na rastući polipeptidni lanac na ribosomu. tRNA osim svoje translacijske uloge ima i mnoge druge kao što su regulacija translacije, odgovor na stres, signalizacija i interakcija s ostalim biomolekulama. Kako bi tRNA mogla ispuniti svoje funkcije nije dovoljna transkripcija, već se na njoj moraju napraviti određene kemijske, a samim time i strukturne promjene koje joj to omogućuju – te promjene su post-transkripcijske modifikacije.

1.1. Struktura i funkcija tRNA

Kanonska struktura tRNA sastoji se od 76 nukleotida i njena struktura je očuvana kroz sve domene života i posjeduje karakterističnu sekundarnu strukturu djeteline. Završava specifičnim slijedom nukleotida na 3' kraju – CCA. Hidroksilna skupina na 2. ili 3. položaju terminalne riboze na 3' kraju služi kao mjesto za aminoacilaciju. Struktura je podijeljena na specifične regije karakterističnih motiva sekundarne strukture – dihidrouridinska peteljka D-petlja, antikodonska petlja i timin-pseudouridin-citozin petlja (TΨC). Da bi se postigla pravilna terciarna L-struktura, formira se zavojnica niza 12 parova baza između TΨC-petlje i akceptorskog kraja, a između D petlje i antikodonske peteljke I petlje formira se niz od 10 parova baza. Kut terciarne strukture ostvaren je pomoću visokoočuvanih nukleotida TΨC petlje i D stem-petlje koji međusobnim interakcijama stabiliziraju strukturu. Varijabilna petlja je mjesto gdje ćemo pronaći dodatne nukleotida izvan okvira standardnog broja od 76. Uz citoplazmatske tRNA, eukariotske stanice sadrže i mnoge mitohondrijske tRNA koje su kraće nego citosolni analozi. Monomeri nukleotida sadrže ribozni šećer, fosfatnu skupinu i jednu od 4 različite dušične baze: adenin, uracil, citozin i gvanin. Dok polipeptidi koriste kemijski raznoliki set gradivnih jedinica – tRNA molekule jesu limitirane na 4 ribonukleozida koja se ugrađuju tijekom transkripcije, ali je njihova kemijska raznovrsnost osigurana posttranskripcijskim modifikacijama.¹ Generalno dijelimo modifikacije na one koje utječu na strukturu tRNA i one koje su specifično ciljane na funkcijske centre tRNA, tj. na antikodonskoj sekvenci ili na sekvenci bitnoj za aminoacilaciju.² Modifikacije pronađene na petljama tRNA najčešće utječu na strukturu, smatanje i stabilnost, dok one koje se javljaju na raznim mjestima osiguravaju prepoznavanje tRNA od strane aaRS.³



Slika 1 Sekundarna struktura djeteline tRNA, s naznačenim dijelovima i često modificiranim položajima nukleotida.

Značenje simbola i kratica modifikacija objašnjena je u nastavku. $m^x X$ – metilacija na poziciji nukleotida baze X;

$m^{n,x}X$ – dimetilacija na poziciji nukleotida baze X; s^xX – zamjena kisika sumporom na poziciji n nukleotida X;

mnm^5s^2U – C-5 metilaminometiltiouridin; mnm^5s^2U – C-5 metilaminometiluridin; yW – vibutozin; imG – viozin;

i^6A – izopenteniladenozin; t^6A – N-6 treoniladenozin;

(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

Primarna funkcija eukariotske tRNA je dostava aminokiselina do ribosoma prema kodonu mRNA. Danas je međutim poznato da eukariotske tRNA također služe i mnogim drugim funkcijama u procesima kao što su označavanje proteina za degradaciju, signalizacija kod metabolizma aminokiselina, regulacija apoptoze vezanjem citokroma c. tRNA služe i kao klice za obrnutu transkripciju kod retroviralne replikacije.

tRNA ima ulogu čak i kod regulacije translacije i staničnog odgovora na stres, odnosno nepovoljne uvjete u okolini.

§ 2. POSTTRANSKRIPCIJSKE MODIFIKACIJE

Posttranskripcijske modifikacije tRNA ključne su za sve funkcije i svojstva tRNA kao što su smatanje, stabilnost i dekodiranje, a otkriće samih modifikacija i modifikacijskih enzima otvorilo je put integraciji translacije s ostalim staničnim procesima kao što su transkripcija, metabolizam i odgovor na stres. Ispitivanje tRNA-modifikacijskih enzima pokazuje da su modifikacije evolucijski očuvane, no rješenja kojima se one ostvaruju se u mnogočemu razlikuju ovisno o vrsti organizma.¹ Citoplazmatske tRNA su transkribirane u jezgri pomoću DNA ovisne RNA-polimeraze – RNA Pol III koja ima za ulogu transkribirati male molekule RNA. Nakon transkripcije, tRNA prolaze kroz ogroman broj post-transkripcijskih preinaka. Odsutnost nekih modifikacija ima tako malen utjecaj na fenotip organizama, da je ponekad teško shvatiti njihov utjecaj na staničnoj razini, a uz to visoka umreženost i međuovisnost modifikacija čini još težim shvaćanje utjecaja pojedinačne modifikacije na tRNA.² Otprilike 150 različitih modifikacija je identificirano u molekulama tRNA², a većina ih se nalazi na pozicijama 34 i 37 antikodonske peteljke I petlje.¹ Većina modifikacija tRNA identificirano 70-ih, otkriće enzima je kasnilo, no danas je identificirano većina enzima i gena koji kodiraju za njih.¹ Iako su modifikacije koje utječu na osnovne funkcije tRNA predvidljivo bitne, većina modifikacija ipak igra tihu strukturnu ulogu kojom utječe na stabilnost i smatanje tRNA.² tRNA zbog svoje uloge u pravilnom dekodiranju i biosintezi proteina ključne su za preživljavanje stanica, stoga i ne čudi što je veliki dio staničnog genoma posvećen upravo osiguravanju pravilne funkcije tRNA. Između 1 i 10% gena će ovisno o genomu kodirati za enzyme modifikacije tRNA što je više nego li za same tRNA što dodatno naglašava važnost modifikacija za svaku funkciju tRNA.⁵

Prije prepoznavanja pravilne tRNA za aminoaciliranje pomoću aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS), prekursorske tRNA (pre-tRNA) moraju u proces sazrijevanja u kojem se događaju specifične strukturne promjene koje daju funkcionalnost tRNA. Proces sazrijevanja događa se u više koraka – splicing, procesiranje 3' i 5' kraja i mnoštvo nukleozidnih modifikacija koje uključuju 25 različitih metilacija riboze ili baze, deaminacije, izomerizacije i pregršt jedinstvenih adicija na baze.¹ Nakon tih koraka aaRS aminoaciliraju 3' kraj tRNA koja je tada spremna ući u proces biosinteze proteina. U nekim slučajevima

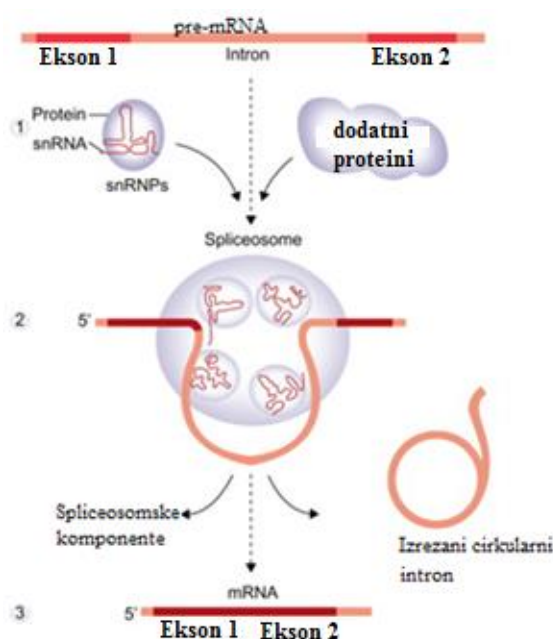
aminoacilirana tRNA (aa-tRNA^{aa}) mora ući u dodatne korake sazrijevanja prije no što krene u biosintezu proteina.⁶

2.1. Izrezivanje introna

Za razliku od prokariotskog, većina eukariotskog genoma je protkana sa slijedovima koji se ne eksprimiraju – te regije nazivaju se intronima. Već je tijekom vrlo ranih faza istraživanja pronađeno da su veličine primarnih transkripata puno veće nego što bi se očekivalo po proteinima koje kodiraju.⁷ Štoviše eukariotski kodirajući geni sadrže 4-10 puta više introna od eksona. Postoji 8 tipova introna u živom svijetu, a razlikujemo ih po načinu izrezivanja.

7 tipova prisutno je kod eukariota, a bitna za razmatranje su nam 3 tipa: spliceosomski introni, introni grupe I, i introni u pre-tRNA. Spliceosomski introni čine najveću grupu introna koju nalazimo u jezgrinom genomu svih eukariota. Ime su dobili po velikom ribonukleoproteinskom kompleksu – spliceosomu koji ih izrezuje, a njihova veličina je između desetak baza i sto kilobaza.⁸

Spliceosom čine specijalizirani kompleksi RNA i proteina, tzv. mali jezgri ribonukleoproteini - snRNP, a svaki snRNP sadrži jednu klasu eukariotske RNA dugu između 100 i 200 nukleotida. Takva RNA naziva se mala jezgrena RNA ili snRNA.^{9, 10}



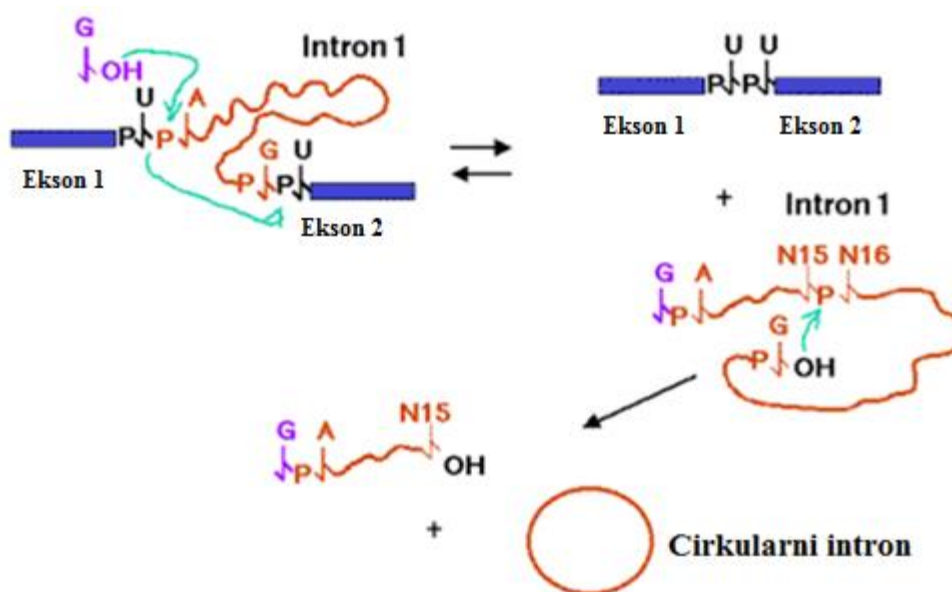
Slika 2 Mehanizam izrezivanja spliceosomskih introna.

(Preuzeto i prilagođeno iz <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/spliceosome>, datum pristupa 15.8.2019.)

Postoji pet snRNA (U1, U2, U4, U5 i U6) koje su prisutne u velikim količinama u jezgri eukariota i sudjeluju u izrezivanju RNA. snRNA i snRNP evolucijski su vrlo očuvani u eukariotima, sa malim ili gotovo nepostojećim razlikama u strukturi i mehanizmu od kvasaca do ljudi⁹. Takvi introni najčešće posjeduju GU dinukleotid na 5' kraju i AG na 3' kraju koji signaliziraju mjesto za izrezivanje.⁹

Introni grupe II nalaze se kod većine eukariota i nekih prokariota, ali ne i kod kralješnjaka. Ako izoliramo RNA sa takvim tipom introna sa bilo kojim slobodnim gvanozinskim nukleotidom (GMP/GDP/GTP) u otopini bez prisutstva enzima otkriveno je da će se ti introni sami izrezati u 3 koraka (Slika 3):

- 1) 3'-OH skupina gvanozina graditi će fosfodietersku vezu s 5' krajem introna, oslobađajući pritom 5' kraj eksona.
- 2) 3'-OH terminalna skupina formirati će fosfodietersku vezu s 5' krajem oslobođenim u prethodnom koraku izrezujući pritom intron.
- 3) 3' terminalna skupina introna gradi fosfodietersku vezu s 5' krajem ciklizirajući ga.¹¹



Slika 3 Mehanizam samoizrezivanja kod introna grupe II.

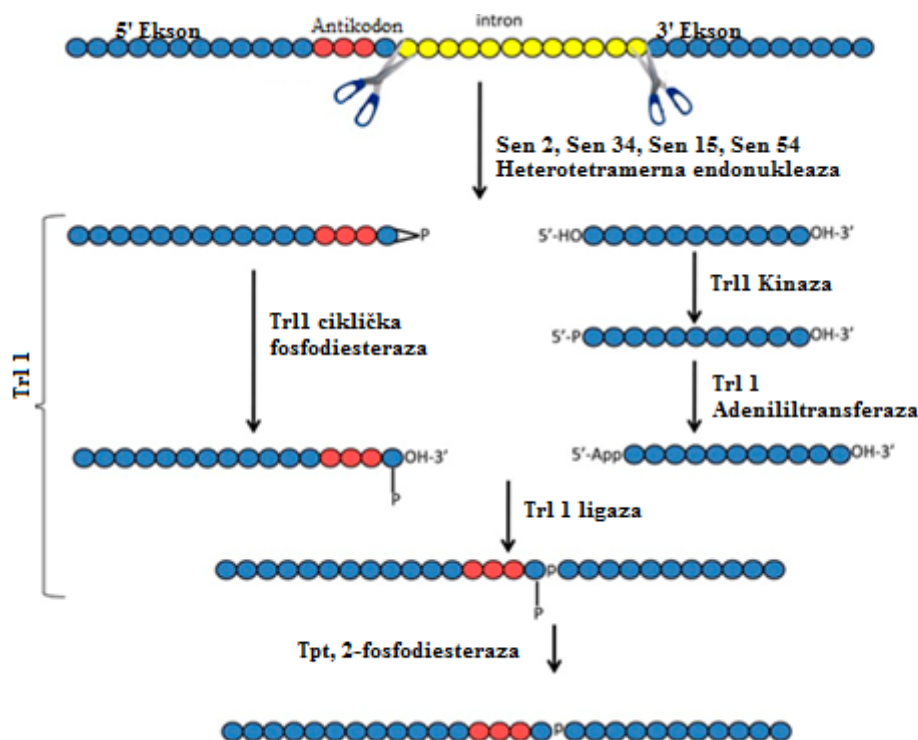
(Preuzeto i prilagođeno iz

[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_\(Hardison\)/Unit_III%3A_The_Path_way_of_Gene_Expression/12%3A_RNA_processing/12.4%3A_Self%E2%80%91splicing_by_group_I_introns_\(pre%E2%80%91rRNA_of_Tetrahymena\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_(Hardison)/Unit_III%3A_The_Path_way_of_Gene_Expression/12%3A_RNA_processing/12.4%3A_Self%E2%80%91splicing_by_group_I_introns_(pre%E2%80%91rRNA_of_Tetrahymena)), datum pristupa 15.8.2019.)

Prve dvije skupine introna pronalazimo kod mRNA i bitno se razlikuju od pre-tRNA introna koji imaju vlastiti način prekrajanje. mRNA je i dalje bitan faktor za post-transkripcijske modifikacije tRNA jer kodira za enzime koji služe modificiranju tRNA.

Kao što smo već spomenuli, introni prekidaju kontinuitet mnogih eukariotskih gena, stoga je njihovo izrezivanje važan korak za ekspresiju gena. tRNA geni su također prekinuti intronima, ali je mehanizam izrezivanja drugačiji nego kod mRNA jer je kataliziran sa 3 enzima koji djeluju uz hidrolizu ATP-a stoga se i izrezivanje introna događa u 3 koraka (Slika 4).

Eukariotska endonukleaza prepoznaje mjesta izrezivanja na pre-tRNA, na primjeru kvašćeve tRNA pokazano je da ona sadrži introne sačuvanog niza purinskih baza na udaljenosti tri nukleotida od 3'- izrezujućeg mjesta. Purin sa te pozicije se mora spojiti s pirimidinom na poziciji 32 antikodonske petlje kako bi ga endonukleaza mogla prepoznati.⁹ U prvom koraku se pre-tRNA cijepa na 2 mjesta pomoću endonukleaze, a produkti su dvije tRNA „polumolekule“ eksona i linearni intron sa 5'-OH i 3'-OPO₃²⁻. Drugi korak reakcije je ligacija 5' i 3' eksona uz tRNA-ligaznu aktivnost Trl1. Prvo se otvara ciklički fosfat sa 5' eksona što je katalizirano Trl1 cikličkom-fosfodiesteraznom aktivnošću. Zatim se 5' kraj 3'eksona fosforilira Trl1 kinaznom aktivnošću koristeći GTP. Nakon toga se 5' kraj aktivira prijenosom AMP-a na 5'-OPO₃²⁻. Zatim Trl1 spaja „polumolekule“ eksona nastale endonukleaznom aktivnošću. Reakcija rezultira otpuštanjem AMP-a i stvaranjem nove 3' – 5' fosfodieterske veze. Rezidualni 2'-OPO₃²⁻ na mjestu ligacije se miče pomoću 2'-fosfotransferaze (Tpt1) u trećem koraku. Tpt1 prenosi 2'-OPO₃²⁻ na NAD⁺ i stvara ADP-riboza 1", 2"-ciklički fosfat. Ovaj komplicirani mehanizam izrezivanja i sljepljivanja introna tRNA kod kvasaca očuvan je i kod biljaka, no kod kralješnjaka i arheja reakcija je katalizirana proteinskim kompleksom HSPC117. Kod kralješnjaka i arheja ligaza spaja ciklički fosfat na 5'-OH 3' polumolekule i na taj način zaobilazi potrebu za 2'-fosfotransferazom.⁵



Slika 4 Izrezivanje introna kod pre-tRNA.

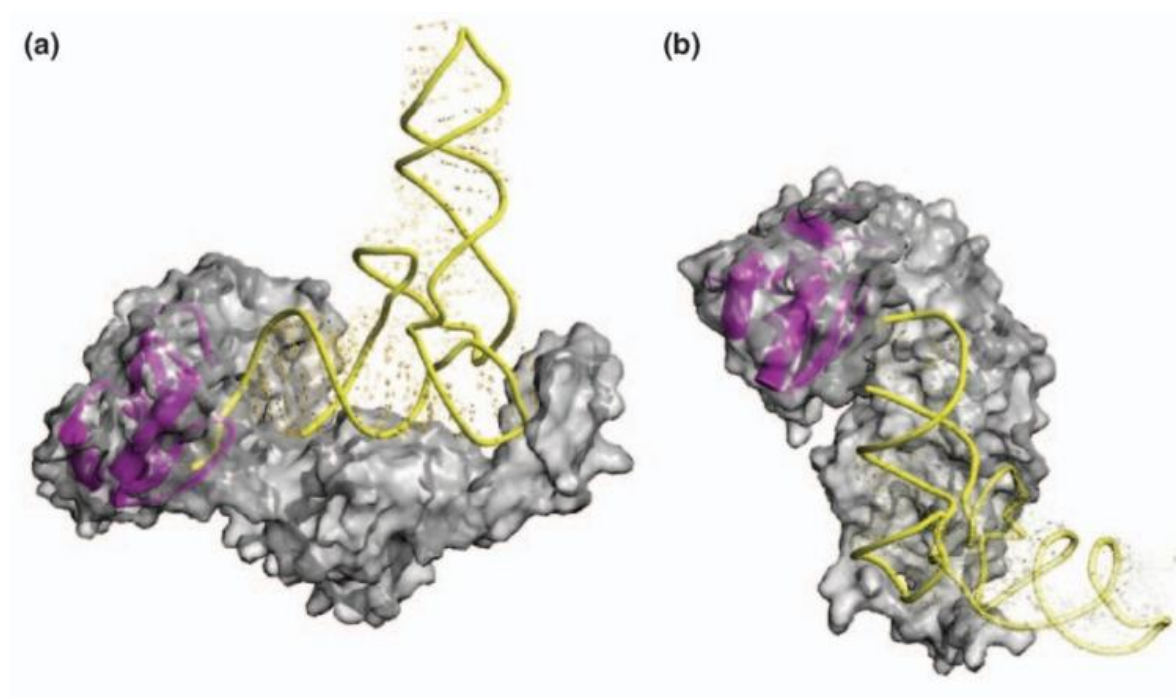
(Preuzeto i prilagođeno iz A. K. Hopper, Genetics 194 (2013) 43–67)

2.2. Modifikacije 3' i 5' kraja

Molekule tRNA dolaze od duljih prekursorskih molekula tRNA enzimskim uklanjanjem nukleotida s 5' i 3' kraja. Endonukleaza RNaza P, prisutna kod svih organizama, cijepa pre-tRNA na 5' kraju. Taj enzim je ribonukleoproteinski kompleks što znači da se sastoji od proteinskog i ribonukleinskog dijela. Eksperimentalno je dokazano, pažljivom disocijacijom proteinske komponente, da je katalitička komponenta RNaze P - RNA. Kod bakterija RNaza P sadrži jednu, kod arheja 5, a kod eukariota 9 ili 10 proteinskih komponenata, što govori o različitoj važnosti proteina za katalitičku aktivnost RNA u Rnazama P u svakoj pojedinoj domeni života. Kod eukariota je tako puno veća važnost proteinskog dijela za katalitičku aktivnost RNA u RNazi P za razliku od arheja i prokariota.¹²

3' kraj tRNA se procesira pomoću jedne ili više nukleaza, uključujući i RNazu D. Na 3' kraju potreban je trinukleotid CCA na koji se veže aminokiselina tijekom sinteze proteina. On je odsutan na primarnom transkriptu kod eukariota i nekih bakterija i potrebno ga je dodati tijekom dorade. Tu adiciju katalizira tRNA-nukleotidil-transferaza, neobičan enzim koji veže

tri ribonukleozid-trifosfatna prekursora i u različitim aktivnim mjestima katalizira stvaranje fosfodiesterskih veza kako bi nastao CCA(3') slijed, što znači da za adiciju tog trinukleotida nije potreban kalup. Postoje dvije klase tRNA-nukleotidil-transferaza : klasa I i klasa II. Enzimi klase I i klase II razlikuju se po primarnom slijedu aminokiselina, ali su sličnih dimenzija i arhitekture domena i kataliziraju istu reakciju – adiciju CCA trinukleotida na 3' kraj tRNA.⁹ Obje klase enzima sastoje se od 3 domene koje nazivamo vratom, tijelom i repom, a tijelo ima motiv za prepoznavanje RNA. Najveća razlike između klasa je međusobni položaj repa i tijela na koje se veže T-petlja i akceptorska pozicija tRNA (Slika 5). Zbog različitog primarnog slijeda, pretpostavlja se da su te dvije klase tRNA-nukleotidil-transferaza nastale evolucijski neovisno.¹³



Slika 5 Kristalne strukture kompleksa tRNA vezane za nukleotidil-transferazu a) skupine I, b) skupine II.
(Y. Xiong, T. A. Steitz, *Cur. Op. in Struct. Biol.*, 16 (2006) 12–17)

2.3. Modifikacije nukleotida tRNA i njihove funkcije

Za razliku od modifikacija DNA kojih je nekolicina, RNA modifikacija pronađeno je preko 150 kroz sve tri domene života. Vrste modifikacija razlikuju se od organizma do organizma, a raznolikost se povećava od bakterijskih i organelnih tRNA prema eukariotskim tRNA. Gotovo je 10 puta više modificiranih nukleotida tRNA (u prosjeku 17% tRNA) nego kod ostalih bioloških RNA. Usporedba modificiranih tRNA arheja, bakterija i eukariota pokazala je 18 univerzalnih modifikacija koje se javljaju u sve tri domene života (slika 6).² Neke modifikacije evolucijski su visoko očuvane kroz sve domene života, a neke se razlikuju od tRNA do tRNA istog organizma. Postoji otprilike 300 tRNA gena u humanom genomu koji se eksprimiraju, a broj genetskih kopija i raznolikost genetskih sekvenci varira unutar populacije.⁴ Unatoč očuvanju nekih modifikacija, primjerice kod m¹G, enzimi koji ih modificiraju ne moraju biti evolucijski očuvani stoga dolazimo zaključka da su iste posttranskripcijske modifikacije nukleotida u raznim domenama života rezultat konvergentne evolucije. Te univerzalne modifikacije nukleotida najčešće su vrlo jednostavne kemijske preinake kao što je na primjer metilacija raznih pozicija u nukleotidnim bazama i/ili ribozama, zamjena kisika sa sumporom (tiolacija), izomerizacija, redukcija uridinske baze do pseudouridina, dihidrouridina, ili adicija relativno malih kemijskih funkcionalnih grupa kao što je acetilacija, treonilacija itd.² Neke modifikacije pronađene su samo u jednoj ili dvije domene života. Takve modifikacije povećavaju kemijsku kompleksnost, a postoji i nekoliko primjera adicije kemijskih skupina koje su veće od samih purina ili pirimidina koje se modificira, a mnoge imaju čak i kompleksnije velike strukture. Mnoge takve modifikacije mogu se podijeliti u obitelji sa zajedničkom ili sličnom skupinom koja se adira te zbog toga često dijele relevantne biosintetske enzimske puteve.² Primjerice u eukariotskoj tRNA identificirane su 8 kemijski različitih modifikacija C-5 pozicije kolebljivog uridina (U₃₄), a 7 od tih dijele 5-karboksimetilnu strukturu u srži. Stoga nedostatak barem jednog enzima zaslužnog za modifikacije 5-karboksimetilne strukturne srži utječe na svih 8 modifikacija na položaju C-5. Nedostatak tih enzima i modifikacija ne može se identificirati pregledavanjem nukleotidnog slijeda gena za tRNA, nego samo direktnom analizom molekula tRNA.²

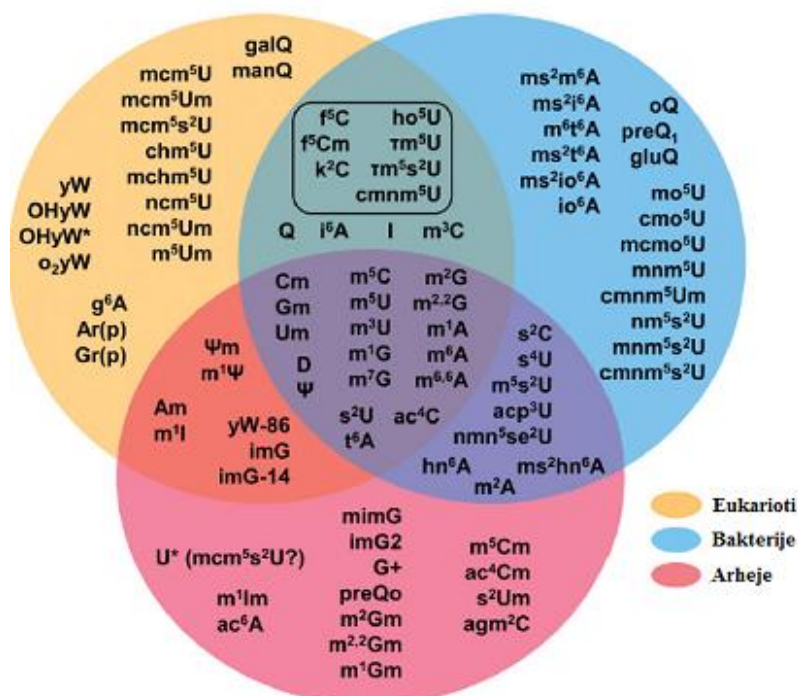
Kroz sva carstva molekule tRNA podliježu najraznolikijim kemijskim modifikacijama kod svih vrsta RNA, zbog čega je tRNA i poslužila za istraživanje utjecaja kemijskih

modifikacija na pravilnu strukturu i funkciju RNA.⁴ Veliki broj molekula tRNA u odnosu na 20 kanonskih aminokiselina korištenih za sintezu polipeptida upućuje na postojanje tRNA-izoakceptora, odnosno molekula tRNA različitih nukleotidnih slijedova, pa čak i različitih antikodonskih sekvenci koje se aminoaciliraju istom aminokiselinom. U višim eukariotima postoje i molekule tRNA istog antikodonskog slijeda, ali različitog ostatka strukture i nazivaju se izodekoderima. Primjerice kod ljudi postoji 39 različitih molekula tRNA specifičnih za alanin (tRNA^{Ala}) podijeljenih u 3 izoakceptorske obitelji sa nekoliko izodekoderata prisutnih u svakoj obitelji!² Primijećeno je da se tip modifikacija razlikuje između različito aminoaciliranih tRNA, pa čak i između međusobno vrlo sličnih izoakceptorskih tRNA. Ovakav stupanj kompleksnosti i raznolikosti tRNA pokazuje da postoji njena važnost izvan poznatih okvira translacije, a pomoću modifikacija tRNA ta raznolikost dignuta je na jedan još viši nivo.⁴

tRNA-modifikacije u srži smotane tRNA utječu na manje izražena svojstva, kao što su povećanje fleksibilnosti odnosno rigidnosti ovisno o vrsti modifikacije.²

Do povećanja rigidnosti primjerice dolazi kod pseudouridinskih baza koje pronalazimo u tRNA, a koje pogoduju 3'-Endo formi šećera na koji su vezane zbog čega pseudouridin može koordinirati dodatne stabilizirajuće molekule vode koristeći N-1 atom koji više ne sudjeluje u glikozidnoj vezi kod izomerizirane forme baze. Za ostale modifikacije kao što su dihidrouridin smatra se da potiču 2'-Endo formu šećera što potiče porast fleksibilnosti tRNA.² Održavanje optimalne strukture tRNA zahtijeva oba tipa modifikacija i sugerira da je za stabilnost i funkciju potrebna kompleksna međuigra raznih vrsta tRNA modifikacija. Nadalje, primijećeno je da se tRNA nalazi u složenoj ravnoteži između rigidne i fleksibilne strukture zbog različitih modifikacija nukleotida prisutnih pri različitim temperaturama.² Ova tvrdnja može se potkrijepiti primjerom organizama u ekstremnim temperaturnim uvjetima kod kojih je jasno vidljiva korelacija vrsta modifikacija tRNA i njene stabilnosti pri takvim uvjetima. Potvrda ove teze jest i da je pronađen povećani udio modifikacija koje promoviraju fleksibilnost kao što je dihidrouridin primijećen kod arheja koje žive u pri ekstremno niskim temperaturama. Difrakcija na kristalima tRNA pokazala je bogatstvo modifikacija, a ti podaci statičkih struktura dovode nas do mnogih zaključaka vezanih uz dinamičke osobine tRNA molekula! Neke od preko 150 pronađenih modifikacija nukleotida,

kao što su izopentenil adenzin ili vibutozin (yW) su rijetke i kemijski kompleksne, dok ih je većina kao što su dihidrouridin ili pseudouridin jednostavne i prisutne kod gotovo svake tRNA. Po jednoj molekuli tRNA prisutan je samo mali dio modifikacija, tako je po prosječnoj ljudskoj tRNA prisutno 11-13 modifikacija.⁴ Veliki broj jedinstvenih modifikacija tRNA pruža model za istraživanje velike kemijske raznolikosti tRNA, a u idućim odlomcima nalazi se pregled nekolicine istraženih kemijskih modifikacija specifičnih za tRNA nukleotide. U proučavanju modifikacija vrlo je zahtjevno identificirati, mapirati i okarakterizirati različite modifikacije, no s nedavnim procvatom genetske tehnologije to polje se vrlo brzo razvilo.



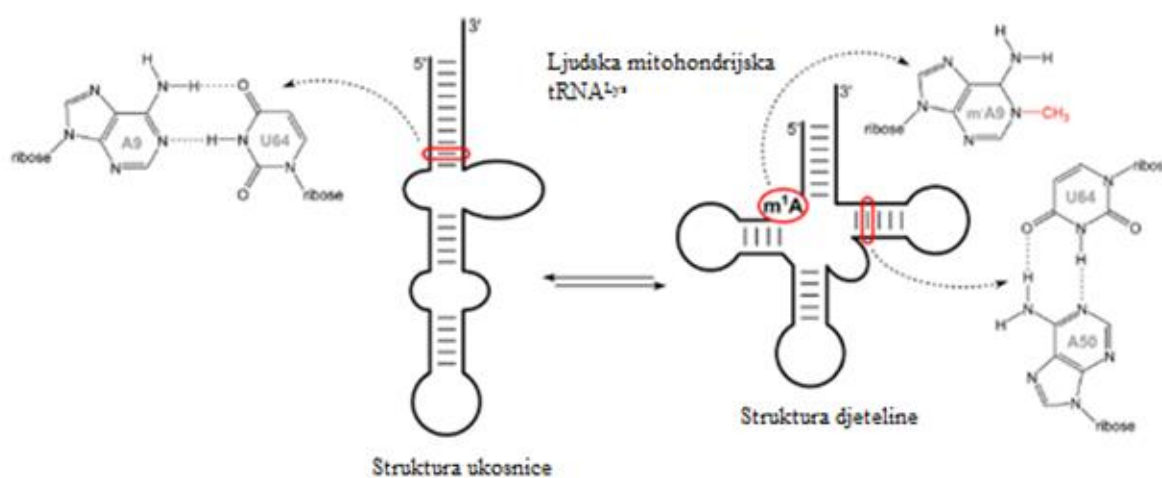
Slika 6 Vennov dijagram kemijskih modifikacija tRNA pronadenih kod barem jedne vrste eukariota, bakterija i arheja. Uokvirene modifikacije pripadaju molekulama tRNA organela. Značenje simbola i kratica modifikacija objašnjena je u nastavku. mⁿX – metilacija na poziciji nukleotida baze X; m^{n,n}X – dimetilacija na poziciji nukleotida baze X; sⁿX – zamjena kisika sumporom na poziciji n nukleotida X; X_m – 2'-O metilacija nukleotida X; D – dihidrouridin; Ψ – pseudouridin; ac⁴C – N-4 acetilcitolin; i⁶A – izopenteniladenozin; t⁶A – N-6 treoniladenozin; g⁶A – N-6 glicinilkarbamoidadenozin; io⁶A – N-6 (cis-hidroksipentenil)adenozin; hn⁶A – N-6 hidroksinorvalilkarbamoidadenozin; ac⁶A – N-6 acetidiladenozin; Xr(p) – 2'-O ribozilfosfatni derivat nukleotida X; f⁵C – formilcitolin; k²C – lizidin; agm²C – agmatidin; acp³U – 3-(3-amino-3-karboksipropil)uridin; mcm⁵U, C-5 metoksikarbonilmetil uridin; mnm⁵U – C-5 karbamoidmetil uridin; chm⁵U – C-5 karboksihidroksimetil uridin; ho⁵U – C-5 hidroksiuridin; mo⁵U – C-5 metoksiuridin; cmo⁵U – uridin 5-oksiacetilna kiselina; mcmo⁵U – uridin 6-oksiacetilna kiselina metilester; mnm⁵U – C-5 metilaminometiluridin; cmnm⁵U – C-5 karboksimetilaminometiluridin; nm⁵U – C-5 aminometiluridin; Q – kveozin (i srodne 7-deaza vrste – oQ, preQ₁, preQ₀, gluQ, galQ, manQ); G⁺ – arheozin; yW – vibutozin (i srodne OHyW, OHyW*, o2yW i yW vrste); imG – viozin (i srodne imG-14, mimG i imG2 vrste).

(Preuzeto i prilagođeno iz J. E. Jackman, J. D. Alfonzo, *Wiley Interdiscip Rev* (2013) 4 35-48)

2.3.1. N^1 -metiladenozin u tRNA

U 2D strukturi tRNA primijećeno je da je 9. pozicija ključna za pravilno smatanje tRNA, a osobito važna za smatanje manje mitohondrijske tRNA.

N^1 -metiladenozin na A₉ poziciji može ometati Watson-Crick parove baza da ne dođe do interakcija unutar petlje tijekom sazrijevanja mitohondrijske tRNA^{Lys}, što pogoduje nastanku dobro poznate djetelinaste sekundarne strukture. Nedostatak te modifikacije pogoduje sparivanju spomenutih Watson-Crickovih parova i uzrokuje promjenu ravnoteže prema formi ukosnice koja nije pogodna ni za aminoacilaciju ni za translaciju.⁴ Tijekom dozrijevanja tRNA^{Lys}, m¹A₉ modifikacija dodatno je stabilizira za iznos između 0,7kcal/mol i 1kcal/mol ovisno o koncentraciji Mg²⁺ iona. Ova strukturna ovisnost mitohondrijske tRNA^{Lys} o spomenutoj modifikaciji jedna je u nizu modifikacija koje se pojavljuju u životinjskoj biogenezi tRNA (Slika 7).⁴

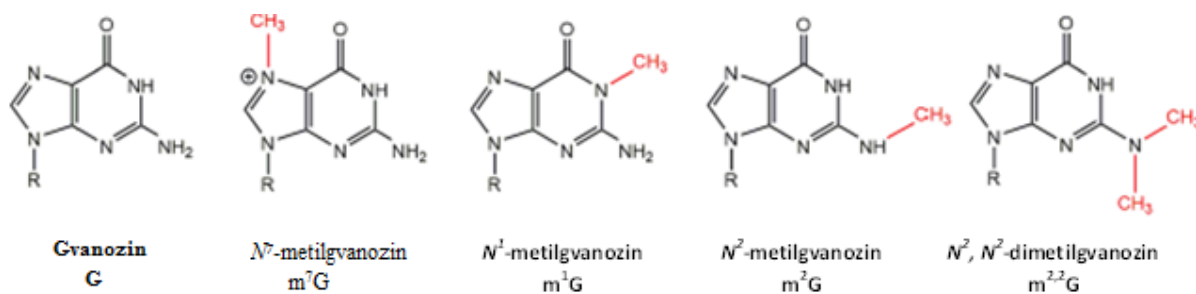


Slika 7 Utjecaj m¹A na stabilizaciju funkcionalne 2D strukture mitohondrijske tRNA^{Lys}.

(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

2.3.2. Metilirani gvanozin i derivati

Već smo naglasili da metilacija nukleotida može igrati veliku ulogu u sazrijevanju velikog broja tRNA. Jedan od ključnih koraka zrenja tRNA je savijanje RNA prema unutra kako bi se formirala sekundarna struktura djeteline sa karakterističnim petljama i L oblikom tercijarne strukture. Metilacije (slika 8) su ključne u toj strukturi za formiranje pravilnih interakcija koje srž drže dovoljno otvorenu za pravilno smatanje. 2-metilgvanozini odnosno N^2 -metilgvanozin (m^2G), N^2, N^2 – dimetilgvanozin ($m^{2,2}G$) i $N^2, N^2, 2'$ -O-trimetilgvanozin ($m^{2,2}G_m$) su evolucijski visoko očuvani u tRNA na pozicijama 10, 26 kroz sve tri domene života. Metilne skupine su locirane na mjestu građenja vodikovih veza između Watson-Crickovih parova čime ometaju sparivanje dušičnih baza. U kontekstu 10. i 26. pozicije one terminiraju par dušičnih baza. Bitno je naglasiti da je m^2G energetski identičan gvanozinu u kontekstu G-C sparivanja u običnoj RNA, ali ima ometajući učinak kod sparivanja u kontekstu tRNA. Nadalje, pokazano je da $m^{2,2}G$ nedvosmisleno ima učinak na stabilnost i svojstva sparivanja baza, ponajviše zbog građenja pseudo-Watson-Crickovih parova s adenozinom. Zanimljivo je da zamjena gvanozina s inozinom pokazuje da 2-metilamino skupina gvanozina tRNA na pozicijama 2,3 i 10 igra važnu ulogu u tRNA-protein prepoznavanju.⁴ Mnoga istraživanja pokazuju kako su evolucijski sačuvane metilacije gvanozinskih nukleotida koji služe kao ključne točke kod prepoznavanja i identifikacije tijekom aminoacilacije. Metilacija gvanozina 26 događa se kod 80% eukariotskih tRNA koje sadrže gvanozin na toj poziciji.⁴ Kristalna struktura RNA dupleksa koji sadrži dva $m^{2,2}G$ -A para pokazuje da se modificirani gvanozin povezuje vodikovom vezom preko iminske skupine zbog čega dolazi do „krivog“ odnosno „ne Watson-Crickovog“ sparivanja u takvim tRNA molekulama. Dokazano je da manjak RNA-polimeraze III uzrokuje povećanu količinu $m^{2,2}G$ tRNA modifikacije kod kvasca i ljudskih stanica.⁴



Slika 8 Strukturne formule metiliranih gvanozina.

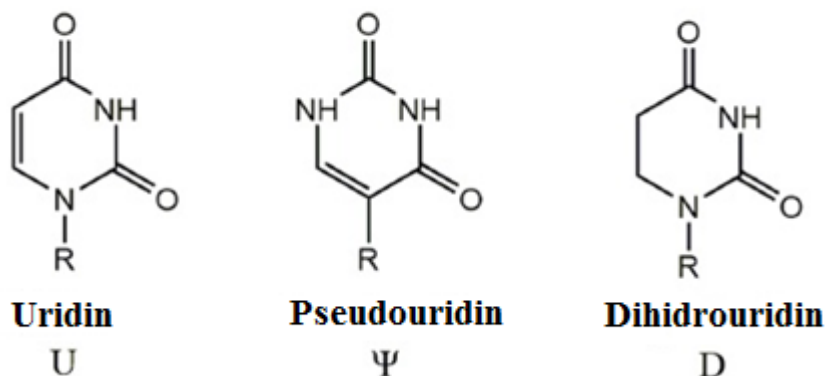
(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

2.3.3. Pseudouridin

Pseudouridin (Ψ) (Slika 9) jedna je od najčešćih modifikacija RNA koja je pronađena kod svih većih skupina RNA (tRNA, rRNA, mRNA) i kod nekih manjih RNA. Ψ je izomer uridina kod kojeg je N^1 -C¹⁰ glikozidna veza između baze i šećera zamijenjena C^{5'}-C^{1'} glikozidnom vezom. Ovakva mala promjena uridina u Ψ stvara značajne strukturne i funkcijske razlike u RNA molekulama.¹⁴ Jedinstvena C-C veza između šećera i baze ima značajnu rotacijsku slobodu, a slobodna N^1 -H imino skupina služi kao dodatni donor vodika izvan Watson-Crickovih dodirnih točaka. U kontekstu tRNA, Ψ će se naći na svakoj petlji u tRNA, ali najčešće igra strukturnu ulogu kao dio T Ψ C ili antikodonske petlje zbog efekta zvanog „sugar puckering“.¹⁴ Zavojnica RNA koja sadrži Ψ će biti termodinamički stabilizirana sa C3'-endo konformacijom. Takav šećer stabilizira lokalne zavoje. Ψ ne utječe na 3D strukturu, ali stabilizirajući efekt na lokalnu strukturu je ključan za održavanje antikodonske petlje stoga i za pravilno vezanje na ribosom i prepoznavanje od strane ribosoma. Vjeruje se da stabilnost antikodonske petlje sa Ψ modifikacijom utječe na bolje vezanje tRNA na ribosom i samim time bolje interakcije kodona i antikodona. Iako Ψ nema ključnu ulogu, ona značajno pospješuje točnost usporavajući brzinu biosinteze proteina.⁴

2.3.4. Dihidrouridin

Dihidrouridin (D) (Slika 9) je vrlo česta i evolucijski sačuvana modifikacija tRNA. Nalazi se unutar D-petlje i pronađena je gotovo u svakom obliku života. Redukcija dvostruke veze između C6 i C5 uridina stvara D, a prisutnost te modifikacije u D-petlji pospješuje nastanak karakteristične sekundarne i tercijarne strukture tRNA. Zbog gubitka aromatičnosti dihidrouridin ne može graditi bazne parove, a ribozni prsten D preferira C2'-endo konformaciju za razliku od uridina. Dihidrouridin destabilizira RNA zavojnice i snizuje točku mekšanja *in vitro*. Dihidrouridin je ključan za pravilno smatanje D-petlje.⁴

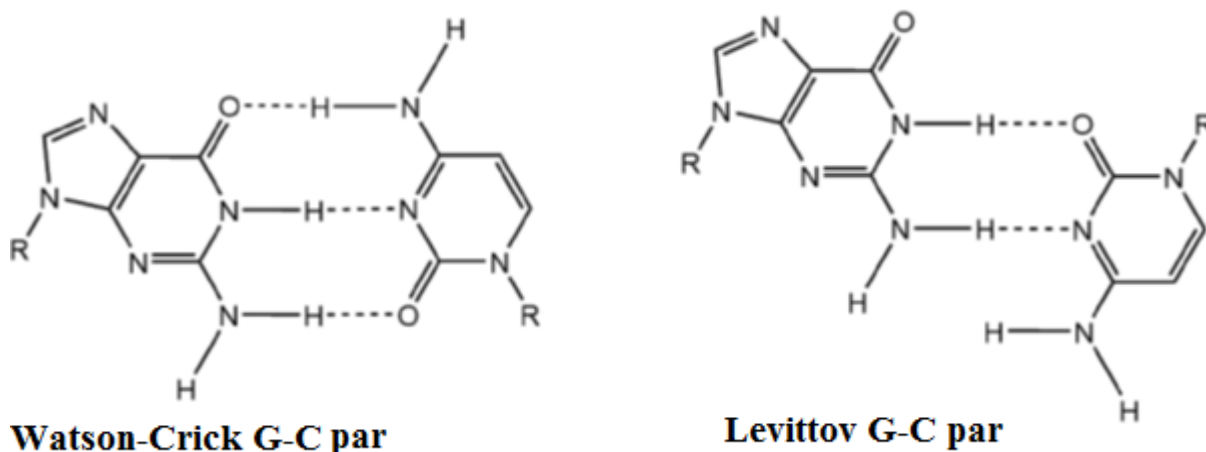


Slika 9 Strukturne formule uridina i njegovih modificiranih derivate - pseudouridina i dihidrouridina.

(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

2.3.5. 5-metilcitozin

Prisutnost 5-metilcitozina - m^5C , se razlikuje kroz domene života. Ovu modifikaciju pronalazimo u tRNA i rRNA eukariota i arheja, ali ne i kod bakterija. Kod bakterija ona je pronađena kod *E. Coli* rRNA. U tRNA m^5C pronalazimo na pozicijama 48 i 49 kao dio spojnice između varijabilne petlje i TΨC petlje, a poznato je da promovira stabilnost tRNA i biosintezu proteina. Metilne skupine m^5C 48 i m^5C 49 se ne nalaze na W-C dodirnim površinama stoga ne utječu na kanonske interakcije između baza. Zajednička komponenta svih tRNA je nekanonsko sparivanje 15. i 48. nukleotida, takav par poznat je i kao Levittov par (Slika 10).



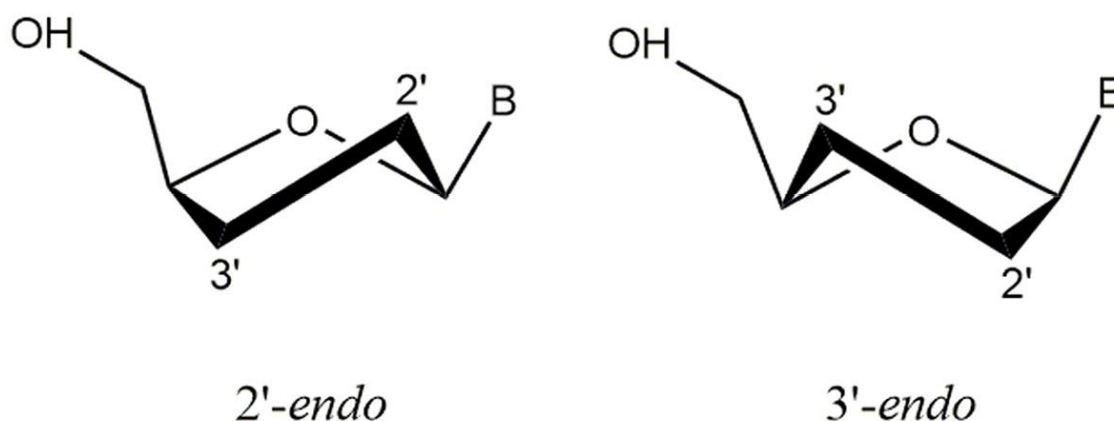
Slika 10 Razlika u sparivanju Watson–Crick parova i Levitt baznog para.

(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

Kod Levittovog para mogu se vidjeti interakcije suprotne geometrije onoj iz W-C para zbog čega dolazi do spajanja D-petlje i varijabilne ruke. Nukleotidi 48 i 49 tRNA su modificirani u m^5C 26% odnosno 80%, ali su strukturalne modifikacije tih nukleotida nepoznate. Strukture s i bez modifikacija m^5C zanemarivo se razlikuju po pitanju svih relevantnih termodinamičkih faktora, no kod miševa i mušica primijećeno je da izostanak m^5C modifikacije uzrokuje probleme u rastu i razvoju.⁴

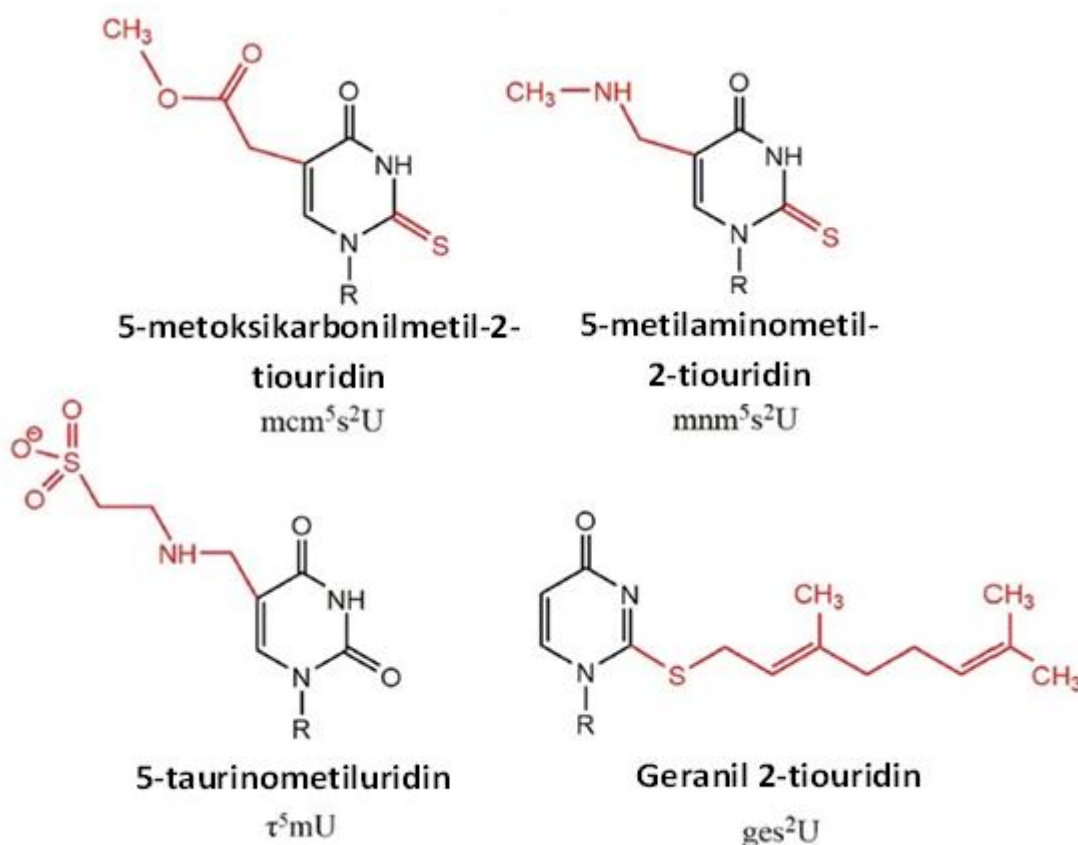
2.3.6. Kolebljiva baza

Kolebljiva baza tRNA nalazi se na 34. poziciji, a njeno ime dolazi zbog Watson-Crick hipoteze da se gvanozin, uridin ili inozin na toj poziciji mogu sparivati sa 2 ili 3 različita nukleotida. Ta ideja se od prvotne hipoteze proširila za kemijske modifikacije položaja kolebljive baze. Modifikacije na poziciji 34 mogu i proširiti i smanjiti raspon dekodiranja tRNA, a posebno ako se radi o uridinu. U živom svijetu tako je primijećeno da je pozicija 34 80% modificirana kroz sve domene života. Modifikacije kolebljive baze nalaze se na C5 poziciji pirimidinskih prstena, odnosno sa suprotne strane Watson-Crick mjesta sparivanja i imaju indirektan efekt na kodon-antikodon interakcije. Najčešći efekt je stvaranje ili C3' ili C2' –endo riboze (Slika 11) što modulira dekodiranje tRNA.⁴



Slika 11 Riboza u 2'-endo i 3'-endo konformaciji stolice, B= dušična baza, R = riboza.
(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

Primjerice, obitelj 2-tio-5-metiluridinskih modifikacija na toj poziciji uzrokuje restrikcije dekodiranja kolebljive baze na adenzin. Nasuprot tome – modifikacije bez sumpora, mogu zauzimati obje konformacije šećera zbog čega povećavaju repertoar kolebljive baze pa je tako moguće dekodiranje adenozina, gvanozina i uridina. 5-taurinometiluridin na poziciji 34 ($\tau^5\text{mU}_{34}$) je značajno veća modifikacija i česta je kod nekolicine mitohondrijskih tRNA. Ova modifikacija doprinosi dekodiranju pomoću stabilizacije U_{34} i G_3 para baza. Kod bakterija geranilirani 2-tiouridin $\text{ges}^2\text{U}_{34}$ dovodi do jednakog sparivanja kao $\tau^5\text{mU}_{34}$. Modifikacije U_{34} u 5-metoksikarbonilmetil-2-tiouridin ($\text{mcm}^5\text{S}^2\text{U}_{34}$) i 5-metilaminometil-2-tiouridin ($\text{mnm}^5\text{S}^2\text{U}$) (Slika 12) obje služe za modificiranje ljudskog i *E.Coli* tRNA^{Lys} UUU antikodona da prepozna kodon AAG.⁴ Kristalne strukture pokazuju da je pomak keto-enolne ravnoteže u smjeru enola, što dozvoljava sparivanje G-U uz zadržavanje Watson-Crickove geometrije. Ovakvo zadržavanje geometrije izbjegava krivo čitanje i pruža širi okvir prepoznavanja u kolebljivom mjestu.



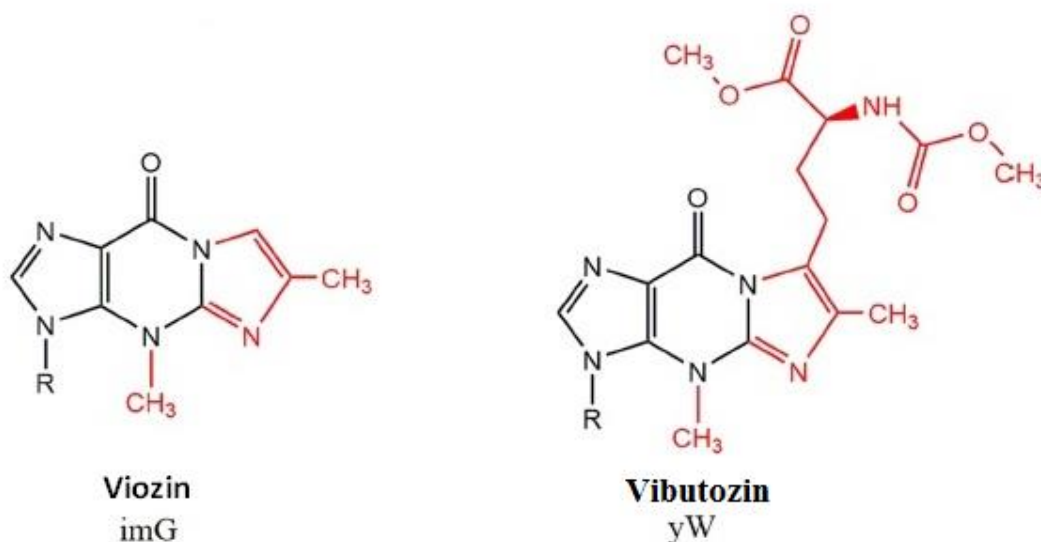
Slika 12 Strukturna formula uridina i njegovih modificiranih derivata.

(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

2.3.7. Pozicija 37

Modifikacije purina³ na poziciji 37 sa 3' krajem nasuprot antikodonu može imati različite efekte na translacijsku točnost i efikasnost.² Općenito, modifikacije na poziciji 37 najčešće grade hidrofobne džepove koji potpomažu sparivanje kodona i antikodona, a istodobno potpomažu recikliranje antikodonske petlje. Prva baza mRNA kodona je uridin ili adenzin, pozicija 37 tRNA gotovo uvijek sadrži modificirani adenzin koji omogućuje kompleksne interakcije. Primjer takvih adenozina su *N*⁶-izopenteniladenozin (*i*⁶A) ili *N*-⁶treonilkarbamiladenozin (*t*⁶A) (Slika 4).⁴ tRNA^{Phe} u arhejama i eukariotima umjesto A₃₇ ima G₃₇ zbog čega može stupiti u interakciju sa U. U slučaju arheja, eukariota i mitohondrijskih tRNA koji sadrže G₃₇ umjesto A₃₇ često su nađeni triciklički viozin (imG) ili njegov derivat vibutozin yW (Slika 13). Takve tRNA također imaju U₃₃ koji bi radio vodikove veze sa A₃₇ ili G₃₇ da nema *N*⁶- modifikacija. Rotacija *t*⁶A i *i*⁶A stvara steričke smetnje i sprečava ulazak nukleotida u zavoynicu, tako onemogućujući stvaranje vodikove veze između A₃₇ i U₃₃.⁴

Kompleksne modifikacije G₃₇ u imG₃₇ ili yW₃₇ pružaju značajnu energetska stabilnost i omogućuju veću preciznost interakcije kodona i antikodona pomoću van der Waalsovih interakcija, hidrofobnih efekata i micanja otapala iz mjesta dodira.

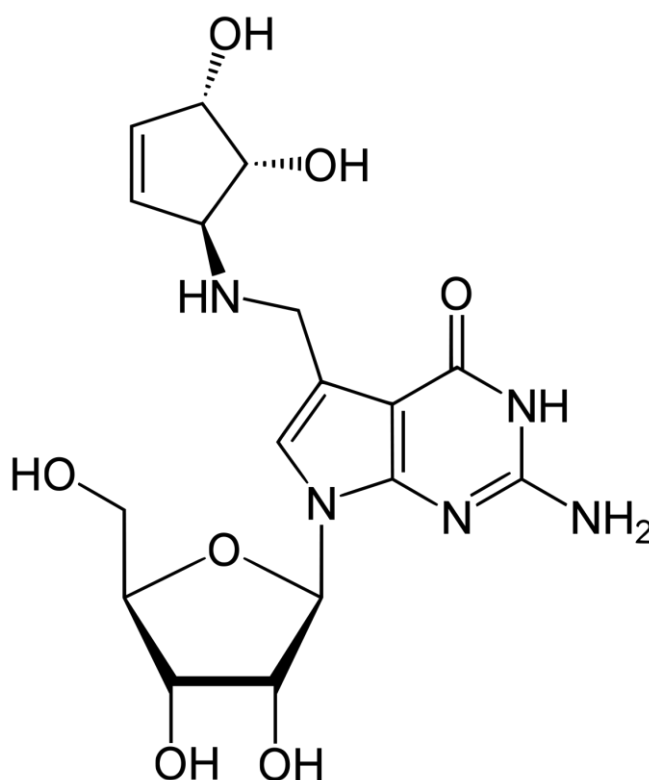


Slika 13 Strukturna formula viozina i vibutozina.

(Preuzeto i prilagođeno iz R. J. Ontiveros et. al., *Biochem. J.* 476 (2019) 1227–1245)

2.3.8. Kveozin

Kveozin – Q (slika 14), derivat GTP-a, je modifikacija koja se nalazi na kolebljivoj bazi tRNA sa GUN antikodonima u mnogim bakterijama i eukariotima. Iako je Q pronađen i u eukariotima i bakterijama, samo su bakterije sposobne *de novo* sintetizirati Q. Biljke i životinje q - kvein unose prehranom. Istraživanja na miševima bez bakterija odnosno aksenskim miševima pokazala su da takvi miševi nemaju kveozinske modifikacije, a dodavanje kveozina u njihovu prehranu uzrokovalo je vraćanje količine modifikacija njihovih tRNA.¹⁵ Q je na taj način uspio povezati tRNA sa vanjskim varijablama. Promjene količine Q modifikacija utječu na mnogo faktora kao što su tolerancija na stres, razmnožavanje stanica i rast tumorski stanica. Teškoće održavanja životinja u uvjetima bez bakterija i bez kveina u prehrani usporila je proučavanje utjecaja Q modifikacije, ali nedavno dobiveni podaci upućuju na to da prisutnost utječe na translacijsku vjernost.¹⁵



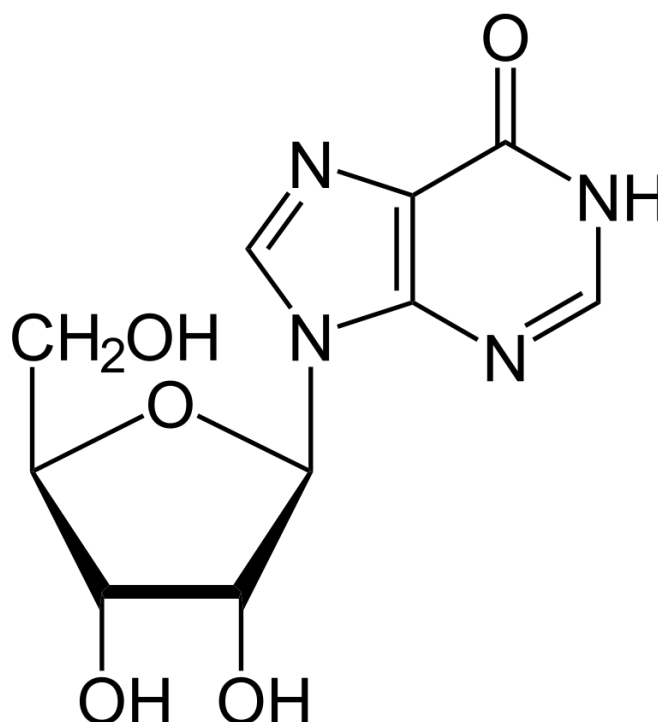
Slika 14 Strukturna formula kveozina.

(Preuzeto iz https://en.wikipedia.org/wiki/Queuosine#/media/File:Queuosine_-_Queuosin.svg,

datum pristupa 30.8.2018)

2.3.9. Inozin

Modifikacije adenzina u inozin kod antikodona tRNA pronađene su i kod eukariota i prokariota da bi proširili kapacitet individualnih tRNA i ograničili broj tRNA potrebnih za kodon-antikodon prepoznavanje. Kod sisavaca je inozin (slika 15) kao post-transkripcijska modifikacija pronađena na tri pozicije: 34, 37 i 57. Dokazano je kod kvasaca da m¹I₃₇ nije esencijalna modifikacija, a na 57. poziciji pronađen je isto kao 1-metilinozin, ali njegova funkcija još uvijek nije poznata. Na poziciji 34 (I₃₄) proširuje dekodirajući kapacitet tRNA i opisan je za svaki ANN (Adenzin-nukleotid-nukleotid) antikodon tRNA. U principu se A₃₄ može sparivati samo s kodonima sa U na trećoj poziciji kodona, I₃₄ također se može sparivati sa kodonima sa U, C i A na zadnjim pozicijama kodona. Za ovu modifikaciju zaslužan je heterodimerni enzim ADAT (hetADAT), koji se sastoji od 2 podjedinice ADAT2 i ADAT3. Fenotipne posljedice manjka inozinske modifikacije u tRNA kod ljudi uočene su moduliranjem heterodimernog ADAT enzimskog kompleksa. I₃₄ hipomodifikacija povezana je s mitozom, a missense mutacija ADAT3 gena je povezana sa intelektualnim defektima.¹⁵

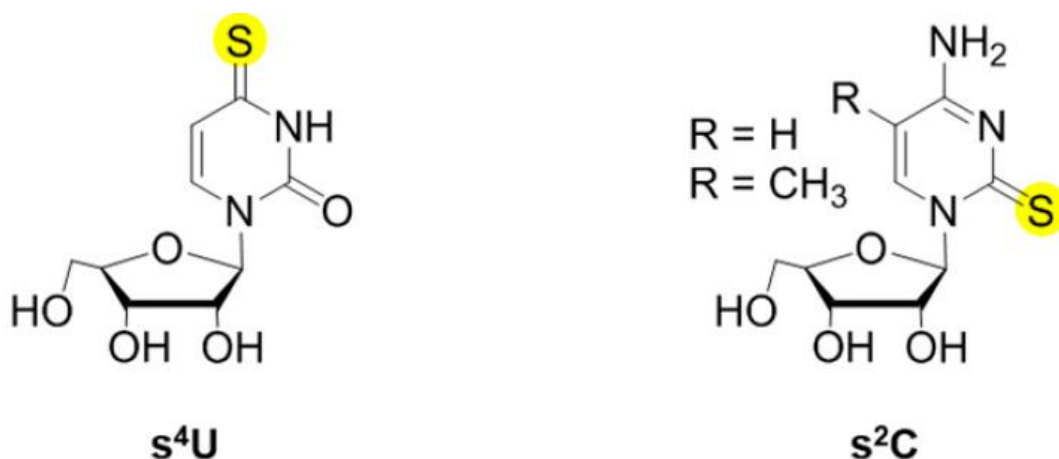


Slika 15 Strukturna formula inozina.

(Preuzeto iz <https://sh.wikipedia.org/wiki/Inozin#/media/Datoteka:Inosin.svg>, datum pristupa 15.8.2019.)

2.3.10. Tiolacija

Tiolacija je posttranskripcijska modifikacija tRNA nukleotida prisutna u svakoj domeni života, a povezana je s mnogim funkcijama. Već smo spomenuli 5-taurinometiluridin ($\tau^5\text{mU}_{34}$), 5-metilaminometil-2-tiouridin ($\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}_{34}$) i 5-metilaminometil-2-tiouridin ($\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$) koje se nalaze na kolebljivoj bazi. Ostale najčešće tiolacijske post-transkripcijske modifikacije uključuju: s^4U_8 i s^2C , ms^2A (Slika 16). 4-tiouridin na poziciji 8 (s^4U_8) jedna je od najdulje poznatih i najbolje proučenih tiolacijskih modifikacija. s^4U_8 služi kao fotosenzor bakterijama i arhejama za odgovor na UV stres. Zbog karakteristične valne duljine $\lambda = 330\text{nm}$, ova modifikacija služila je kao fotoreaktivni analog ribonukleozida u istraživanju RNA sinteze.³ Tiolacija U_{34} služi mnogim funkcijama eukariota, primjerice kod kvasca, tiolacija kolebljivog uridina je osjetljiva na dostupnost nutrijenata, pa tako nedostatak aminokiselina sa sumporom uzrokuje izostanak tiolacije, što uzrokuje poremećaje u rastu i metabolizmu zbog nepravilnog čitanja kodona kojeg uobičajeno čitaju tiolirani uridini. 2-tiouridin s^2U modifikacija najčešće se nalazi na kolebljivoj poziciji antikodona u $\text{tRNA}^{\text{Glu, Gln, Lys}}$ svih organizama. Ova evolucijska sačuvanost modifikacije uz očite metaboličke defekte povezane uz njen nedostatak u mnogim vrstama ukazuje na važnost te modifikacije u metabolizmu. Bakterije s nedostatkom s^2U modifikacije pokazuju vrlo snažne poremećaje u rastu.³ Kod ljudi mutacije unutar gena koji kodiraju za enzime zaslužne za proces tiolacije uzrokuju otkazivanje jetre novorođenčadi, respiratorne poteškoće, disfunkcije auditornog sustava, epilepsiju, ataksiju i demenciju.³



Slika 16 Strukturne formule najčešćih tionukleozida: 2-tiouridin i 2-tiocitozia.

(Preuzeto i prilagođeno iz C. Zheng et al. *Biomol.* 7 (2017) 1-32)

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. B. El Yacoubi, M. Bailly, and V. de Crecy-Lagard, *Annu. Rev. Genet.* **46** (2012) 69–95
2. J. E. Jackman, J. D. Alfonzo, *Wiley Interdiscip Rev* (2013) **4** 35-48
3. C. Zheng, K. A. Black, P. C. Dos Santos, *Biomolecules* **7** (2017) 1-32
4. R. J. Ontiveros, J. Stoute, K. F. Liu, *Biochemical Journal* **476** (2019) 1227–1245
5. A. K. Hopper, *Genetics* **194** (2013) 43–67
6. J. Shepherd, M. Ibba, *FEMS Microbiology Reviews*, **39** (2015) 280–300
7. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry 4th Edition*, J. Wiley & Sons, Inc., (2011) 1338 - 1362.
8. M. Pereira, S. Francisco, A. S. Varanda, M. Santos , M. A. S. Santos, A. R. Soares, *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (2018), 3738
9. M. M. Cox, D.L. Nelson, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th ed., W.H. Freeman & Company, 1033 - 1049
10. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/spliceosome> (Datum pristupa: 15.8.2019.)
11. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_\(Hardison\)/Unit_III%3A_The_Pathway_of_Gene_Expression/12%3A_RNA_processing/12.4%3A_Self%E2%80%91splicing_by_group_I_introns_\(pre%E2%80%91rRNA_of_Tetrahymena\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_(Hardison)/Unit_III%3A_The_Pathway_of_Gene_Expression/12%3A_RNA_processing/12.4%3A_Self%E2%80%91splicing_by_group_I_introns_(pre%E2%80%91rRNA_of_Tetrahymena)) (Datum pristupa 15.8.2019.)
12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2932967/> (Datum pristupa 15.8.2019.)
13. Y. Xiong, T. A. Steitz, *Current Opinion in Structural Biology*, **16** (2006) 12–17
14. C. Lorenz, C. E. Lünse, M. Mörl, *Biomolecules*, **7** (2017) 35
15. F. Tuorto, F. Lyko, *Open Biol.* **6** (2016)
16. https://en.wikipedia.org/wiki/Queuosine#/media/File:Queuosine_-_Queuosin.svg (Datum pristupa 15.8.2019.)
17. <https://sh.wikipedia.org/wiki/Inozin#/media/Datoteka:Inosin.svg> (Datum pristupa 15.8.2019.)