

Evolucijske zavrslame RNaze P: od katalitičke RNA do isključivo proteinskog enzima

Radman, Katarina

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:217:926184>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**Evolucijske zavrslame RNaze P: od katalitičke RNA do isključivo
proteinskog enzima**

**Evolutionary conundrum of RNase P: from a catalytic RNA form
to a protein only enzyme form**

SEMINARSKI RAD

Katarina Radman

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate study of molecular biology)

Mentor: prof.dr.sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2019

Popis kratica:

*At*PRORP – PRORP biljke *Arabidopsis thaliana*

CR – eng. *conserved region*; očuvana regija RNA komponente RNaze P

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

E - enzim

ES – kompleks enzim-supstrat

HARP – eng. *Homologs of Aquifex RNase P*; bakterijska i eukariotska PRORP

LUCA – eng. *Last Universal Common Ancestor* ; zadnji univerzalni zajednički predak

mRNA – glasnička RNA

MRPP – eng. *mitochondrial RNase P protein*; proteinska podjedinica mitohondrijske PRORP

MT – metil-transferazna domena

mt-tRNA – mitohondrijska tRNA

NYN – N4BP1, eng. *YacP-like Nuclease*; metalonukleazna domena PRORP

piRNA – eng. *Piwi-interacting RNA*

Pol I i II – RNA polimeraza I i II

pre-mRNA – prekursorska-glasnička RNA

pre-tmRNA - prekursorska-transportna-glasnička RNA

pre-tRNA – prekursorska-transfer RNA

PPR – eng. *pentatricopeptide repeat*; pentatrikopeptidina ponavljajuća domena

PRORP – eng. *protein only RNase P* ; isključivo proteinska RNaza P

RNA – ribonukleinska kiselina

RNaza P – ribonukleaza P

RNP – ribonukleoprotein

RnpA – proteinska podjedinica bakterijske ribonukleoproteinske RNaze P

S - supstrat

snRNA – eng. *small nucleolar RNA*; mala jezgričina RNA

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Hipoteza RNA svijeta i podrijetlo života	1
3. Diverzitet, distribucija i struktura RNaze P.....	3
3.1. Ribonukleoproteinski oblik RNaze P	4
3.1.1. Bakterijska RNP RNaza P	5
3.1.2. Arhejska i eukariotska RNP RNaza P	7
3.2. Isključivo proteinski oblik RNaze P	9
3.2.1. Eukariotska PRORP.....	9
3.2.2. Arhejska i bakterijska PRORP	11
4. Katalitička moć RNaze P.....	12
4.1. Mehanizam procesiranja pre-tRNA.....	12
4.2. Prepoznavanje pre-tRNA od strane RNaze P	15
4.2.1. Prepoznavanje RNP oblikom RNaze P	15
4.2.2. Prepoznavanje PRORP oblikom RNaze P	17
5. Uloga RNaza P u drugim staničnim procesima	17
6. Zaključak.....	19
7. Literatura.....	20
8. Sažetak	25
9. Summary.....	25

1. Uvod

Enzimi su biološki katalizatori koji sudjeluju u skoro svim biokemijskim reakcijama koje su bitne za održavanje života.¹ Dugo vremena smatralo se da su svi enzimi isključivo proteinske prirode. Osamdesetih godina prošlog stoljeća, Sydney Altman i Thomas Cech, neovisno dolaze do otkrića da i ribonukleinske kiseline (RNA) mogu imati katalitička svojstva.² Ovo otkriće bila je još jedna potvrda hipoteze RNA svijeta koja tvrdi da su RNA molekule postojale na Zemlji prije nastanka modernih stanica te da su one pohranjivale genetičku informaciju i katalizirale kemijske reakcije u primitivnim stanicama prije nego su te uloge redom preuzeli molekula deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i proteini.³

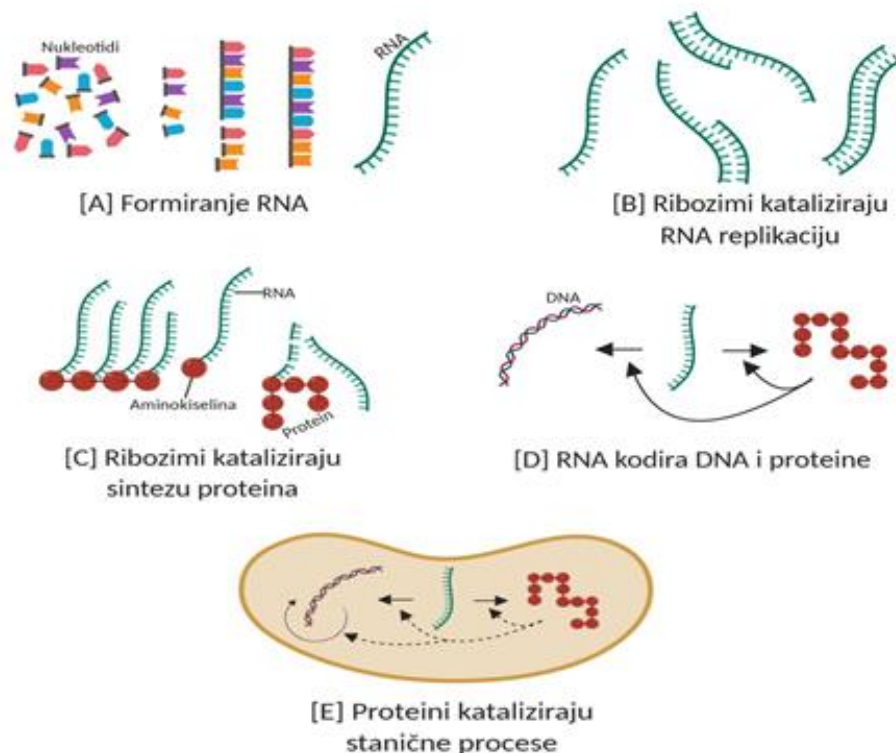
Ribonukleaza P (RNaza P) je endonukleaza odgovorna za katalizu procesiranja 5' kraja molekula prekursorskih transfer RNA (pre-tRNA) u svim domenama života.⁴ Pre-tRNA molekule, koje nastaju transkripcijom gena za tRNA, su nefunkcionalne u translaciji u tom primarnom obliku i moraju biti procesirane kako bi se omogućila sinteza proteina.⁵ Iz tog razloga, RNaza P igra bitnu ulogu u održavanju stanične homeostaze i preživljavanju. Postoje dva tipa RNaze P: (1) RNA-ovisni enzim tj. ribonukleoprotein (RNP) kod kojeg je RNA podjedinica katalitički aktivna te (2) isključivo proteinska RNaza P (PRORP; eng. *protein-only RNase P*). Smatralo se da PRORP oblik RNaze P postoji samo kod eukariota, no ta je pretpostavka opovrgnuta nedavnim otkrićem isključivo proteinske RNaze P u bakterijama i arhejama.⁶ Budući da je ovo otkriće postavilo novu zagonetku u vezi evolucije RNaze P i same hipoteze RNA svijeta, cilj ovog rada je objediniti sva dosadašnja saznanja o RNazi P te ponuditi moguću hipotezu zašto su evolucijski opstala oba oblika RNaze P u svim domenama života te koji je oblik ancestralni.

2. Hipoteza RNA svijeta i podrijetlo života

U modernim organizmima, nukleinske kiseline kodiraju genetičku informaciju koja određuje strukturu enzima, a enzimi kataliziraju replikaciju i popravak nukleinskih kiselina.³ Međusobna ovisnost ove dvije klase biomolekula dovodi do zbunjujućeg pitanja: što je nastalo prvo, DNA ili protein? Mogući odgovor na ovo pitanje je da su i proteini i DNA nastali u otprilike isto vrijeme, a da je RNA prethodila njihovom nastanku (Slika 1).

Ideja da je u razvoju života na Zemlji, evolucija bazirana na replikaciji RNA prethodila pojavi sinteze proteina predložena je šezdesetih godina prošlog stoljeća.^{7,8,9} Sugeriralo se da je u ranim stadijima evolucije života presudnu ulogu katalizatora obavljala molekula RNA, no mogućnost da RNA obavlja ulogu katalizatora i u suvremenim organizmima bila je

zanemarena. Neočekivano otkriće dvaju ribozima, samoizrezujuće molekule RNA kod *Tetrahymena thermophile*¹⁰ te RNaze P kod *Escherichia coli*,¹¹ dovelo je do opsežne rasprave o stvarnoj ulozi RNA u porijeklu života^{12,13} te do stvaranja termina „RNA svijet“.¹⁴ Hipoteza RNA svijeta tvrdi da je moguće da je prvi gen te ujedno i prvi katalizator bila molekula RNA (Slika 1.). Prema ovom scenariju, jedna od najranijih faza biološke evolucije je stvaranje samo-replicirajuće tj. samo-ponavljajuće molekule RNA koja je mogla katalizirati stvaranje drugih molekula RNA s identičnim nukleotidnim slijedom. Koncentracija samo-replicirajuće molekule RNA bi se eksponencijalno povećala (jedna molekula stvori nekolicinu njih, nekolicina stvori mnoštvo i tako dalje). Zbog promjenjivih kemijskih i termodinamičkih uvjeta u okolišu vjernost procesa samo-replikacije nije bila savršena te je dolazilo do pogrešaka u replikaciji koje su stvarale razne varijante molekula RNA. Neke molekule su bile efikasnije i bolje u procesu samo-replikacije nego druge. U konkurenciji za nukleotide, pobjedila bi najbolja samo-replicirajuća nukleotidna sekvenca, a manje uspješne molekule „replikatori“ nestajali bi iz populacije.



Slika 1. Shema scenarija RNA svijeta – od formiranja katalitičkih samo-replikativnih molekula RNA do prvih stanica. Prema hipotezi RNA svijeta na Zemlji je došlo do sinteze nukleotida koji su se zatim spojili u molekule RNA koje pohranjuju „informaciju“ [A], dio nastalih molekula RNA imao je sposobnost samo-repliciranja [B], zbog male vjernosti replikacije nastale su varijante RNA molekule koje vežu aminokiseline i imaju katalitičku sposobnost sinteze proteina [C], DNA zamjenjuje RNA u ulozi pohranjivanja informacije, a proteini preuzimaju ulogu katalize u većini staničnih procesa [D][E].

Prema hipotezi RNA svijeta podjela funkcija između DNA (pohrana genetičke informacije) i proteina (kataliza) odvila se kasnije. Prije toga su nastale nove varijante samo-replicirajućih molekula RNA koje su imale dodatnu sposobnost katalize sinteze peptida iz aminokiselina. Povremeno su formirani peptidi u kompleksu s RNA koji su povećali sposobnost samo-repliciranja RNA. Nastali kompleks RNA-pomoćni peptid mogao je prolaziti daljnje modifikacije u sekvenci koje bi povećale efikasnost samo-replicirajućeg sustava, a istovremeno bi smanjivao mogućnost nastanka štetnih mutacija. Otkriće da i dan danas sve stanice koriste RNA posredovanu katalizu za sintezu peptidne veze, a ne proteinske katalizatore, podržava hipotezu RNA svijeta.

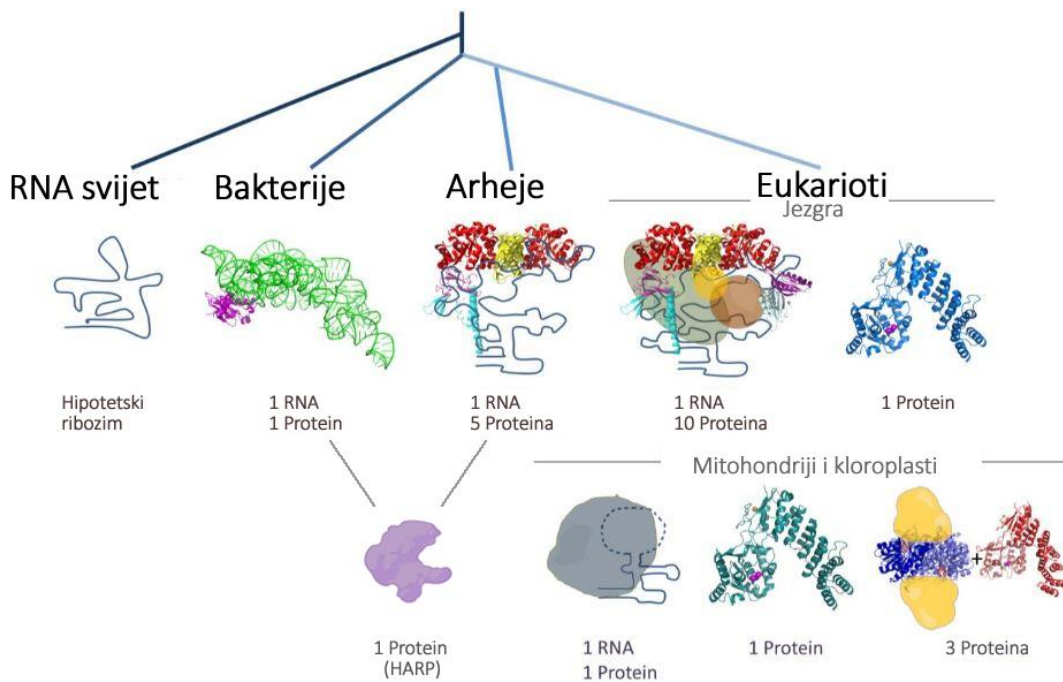
Nakon evolucije primitivnog sustava za sintezu proteina, došlo je do daljnjeg napretka u molekulskom svijetu: molekule DNA sa sekvencom koja je komplementarna samo-replicirajućoj RNA molekuli preuzele su ulogu pohranjivanja genetičke informacije, a RNA molekule evoluirale su za ulogu u sintezi proteina. Proteini su se pokazali kao svestrani katalizatori te su s vremenom preuzeli većinu katalitičkih funkcija koje su prije bile katalizirane od strane RNA molekula. Spojevi slični lipidima počeli su stvarati relativno nepropusne membrane oko samo-replicirajućih molekula. Lipidni odjeljci stvorili su povoljnije uvjete za interakciju proteina i nukleinskih kiselina za proces samo-repliciranja i tako izoliran sustav mogli bi smatrati pretečom suvremenih stanica.^{15, 16}

Scenarij RNA svijeta čini se veoma logičnim i formiran je isključivo na empirijskim podacima prikupljenim u zadnjih 50-ak godina, no postoji nekolicina neodgovorenih pitanja i otkrića koja dodatno ispituju točnost hipoteze RNA svijeta. Jedno takvo otkriće je pronalazak oba oblika RNaze P u svim domenama života.¹⁷

3. Diverzitet, distribucija i struktura RNaze P

Nehomologi izofunkcionalni enzimi su evolucijski nesrodne makromolekule koje kataliziraju istu reakciju.¹⁸ Primjer takve konvergentne makromolekulske evolucije je RNaza P koja predstavlja jedini poznati primjer nehomolognog izofunkcionalnog enzima koji ima ili RNA- ili protein-bazirano aktivno mjesto katalize.¹⁷ Različiti oblici RNP RNaze P i PRORP prisutni su svim domenama života i gotovo svim dosad istraženim vrstama (Slika 2). Jedini organizam kod kojeg nije pronađen niti jedan oblik RNaze P je obligatni simbiot *Nanoarchaeum equitans* koji ne kodira pre-tRNA s produženim 5'-krajem.¹⁹ Postoje mnoge riješene strukture za oba oblika RNaze P uključujući i individualne podjedinice, subkomplekse

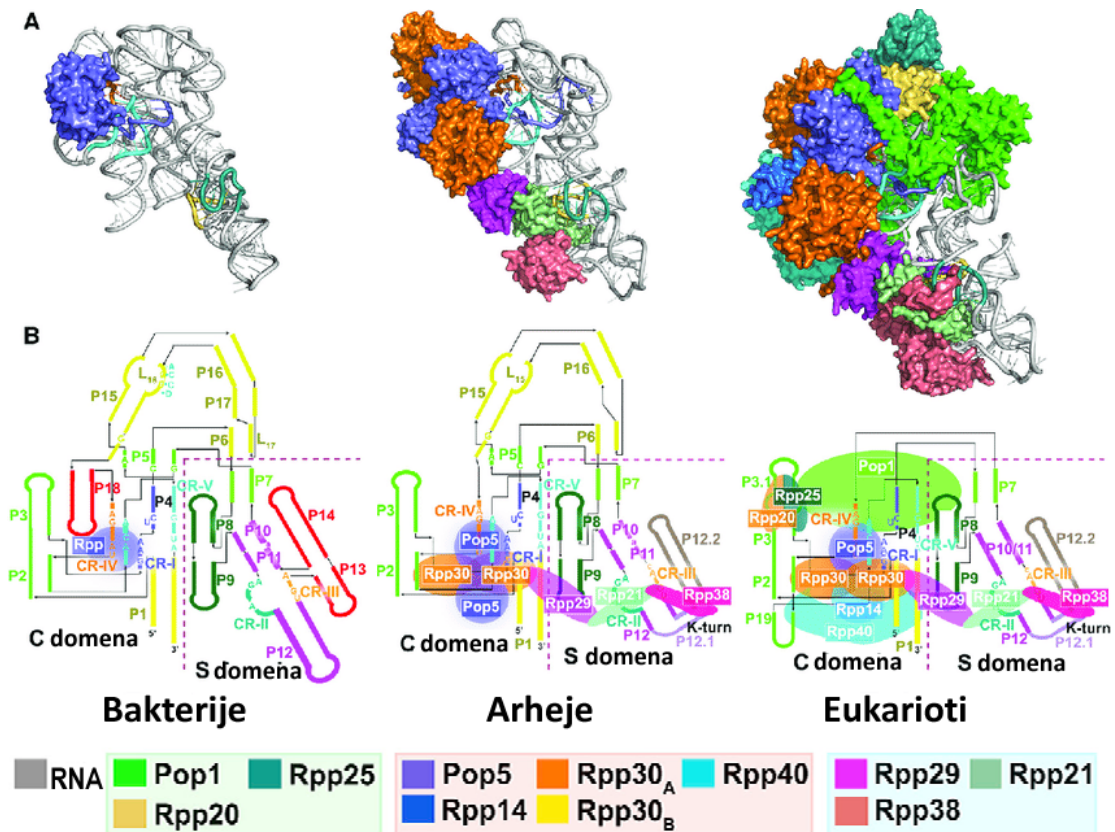
i holokomplekse. Riješene strukture omogućile su uvid u općenite strukturalne značajke RNaze P kao i u strukturalne značajke koje su ključne u katalizi i prepoznavanju supstrata.



Slika 2. Shematski prikaz raspodjele raznih oblika RNaze P u svim domenama života. Sve bakterije posjeduju RNP oblik RNaze P sa samo jednom pomoćnom proteinskom podjedinicom, a samo neke vrste bakterija posjeduju i PRORP oblik RNaze P (HARP). Sve arheje imaju RNP oblik RNaze P s četiri ili pet pomoćnih proteina, a dio arheja uz RNP RNazu P posjeduje i PRORP oblik (HARP). Svi eukarioti posjeduju i RNP i PRORP oblik RNaze P koji se ekprimiraju u različitim staničnim organelima ili jezgri. Preuzeto i prilagođeno iz Howard, M. J. i sur. 2013.²⁰

3.1. Ribonukleoproteinski oblik RNaze P

RNP oblici RNaze P pokazuju znatne razlike u veličini (~135 do 400 kDa) ovisno o varijabilnoj kompoziciji proteinskih podjedinica te duljini RNA komponente. Bakterije imaju jednu katalitičku RNA asociranu s jednom proteinskom podjedinicom,²¹ arheje posjeduju do pet proteinskih podjedinica, a eukarioti do čak deset proteinskih podjedinica asociranih uz jednu katalitičku RNA²² (Slika 3).



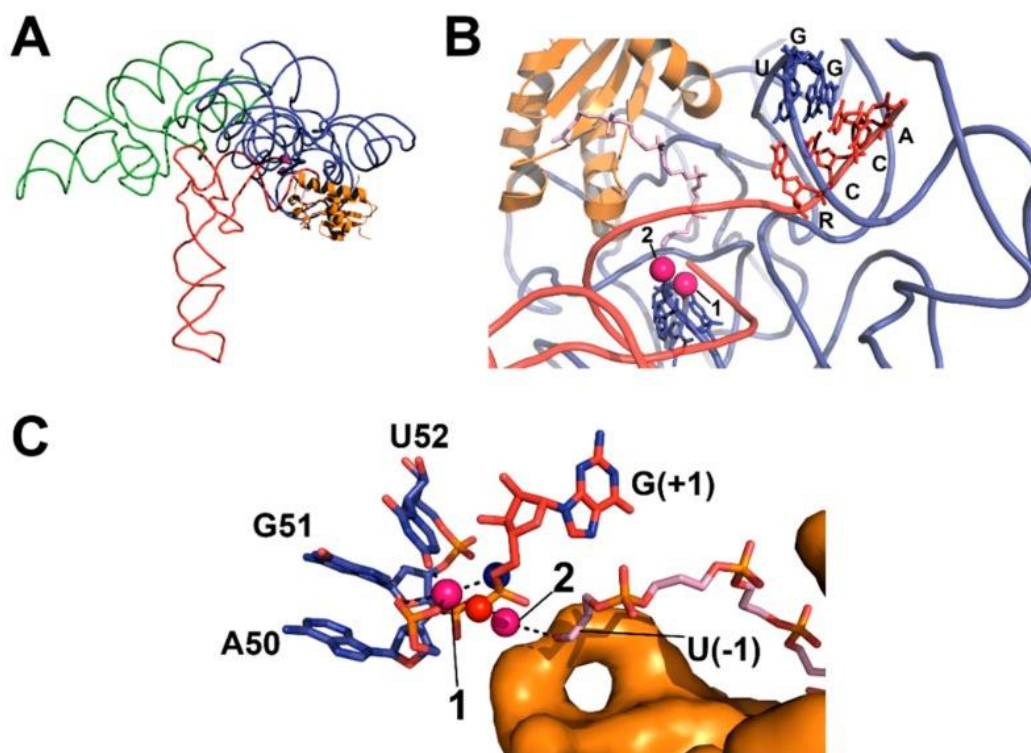
Slika 3. Ko-evolucijski model RNP oblika RNaze P. **A)** Reprezentativne tercijarne strukture RNaza P RNPa iz sve tri domene života. Lijevo - cjelokupna struktura RNaze P iz bakterije *Thermotoga maritima*. Sredina – model cjelokupne strukture RNaze P iz arheje *Pyrococcus horikoshii*, baziran na definiranim strukturama RNaze P bakterije *T. maritima* i čovjeka. Desno – cjelokupna struktura ljudske RNaze P. **B)** Sekundarne strukture RNaza P iz sve tri domene života. Dijelovi označeni s Pop i Rpp predstavljaju proteinske podjedinice RNaze P. Preuzeto i prilagođeno iz Wu i sur. 2018.²³

3.1.1. Bakterijska RNP RNaza P

Bakterijska RNP RNaza P sastoji se od jedne velike RNA komponente koja ima 340-420 nukleotida te od male proteinske podjedinice (RnpA) prosječne veličine 14 kDa.²⁴ Filogenetskom analizom bakterijske RNA komponente, RNaze P klasificirane su u tri tipa. Tip A je najučestaliji u domeni bakterija, tip B pronađen je gram-pozitivnim bakterijama, a tip C, koji sadrži karakteristike tipa A i B, prisutan je u nekim Chloroflexi bakterijama.²⁵ Funkcija RnpA je povećavanje afiniteta RNaze P za pre-tRNA i metalne ione te stabiliziranje enzimsupstrat kompleksa tijekom katalize.²⁶ RnpA sekvence su veoma različite između bakterijskih vrsta, ali su homologne u strukturi i dokazano je da mogu međusobno komplementirati svoje funkcije.²⁷

Svi tipovi bakterijskih RNP RNaza P imaju visoko očuvanu osnovnu strukturu RNA komponente koja uključuje dvije domene, C i S. Domene se neovisno jedna o drugoj smataju u funkcionalne strukturne podjedinice koje zatim skupa djeluju u reakciji procesiranja pre-tRNA. C-domena obuhvaća 60% RNA komponente RNaze P i u njoj se nalazi aktivno mjesto za katalizu procesiranja 5'-vodećeg slijeda molekule pre-tRNA. Ostalih 40% RNA komponente pripada S-domeni koja ima bitnu ulogu u prepoznavanju supstrata tako što stvara specifične interakcije s D- i T ψ C rukom pre-tRNA. RNA komponentu možemo podijeliti i na pet regija s očuvanim nukleotidnim sljedovima, CR (eng. *conserved region*). CR-I,IV i V nalaze se u C-domeni, a CR-II i III u S-domeni. Ovisno o tipu bakterijske RNP RNaze P, CR-I i V sadrže ukupno 11-24 univerzalno očuvanih nukleotida koji se nalaze u peteljki P4. Razlog tako visoke očuvanosti je što se aktivno mjesto RNaze P nalazi u glavnom žlijebu peteljke P4. Aktivno mjesto sadrži dva vezna mjesta za divalentne metalne ione (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}). Struktura RNaze P s vezanom tRNA pokazala je da se metal na poziciji 1 nalazi koordiniran između 5'-vodećeg slijeda tRNA, A50 i G51 fosfata RNA komponente RNPa te O4 kisika univerzalnog U52 nukleotida (Slika 4), dok se metal na poziciji 2 nalazi u neposrednoj blizini fosforilnog kisika nukleotida G51, 3'-OH skupine i 5'-vodećeg slijeda tRNA. Vezanje metala bitno je za samu katalizu reakcije.

Strukturne analize RnpA otkrile su da se struktura RnpA ne mijenja prilikom vezanja za RNA komponentu RNaze P. Cjelokupna topologija RnpA je $\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha$ s dvije regije koje vežu molekulu RNA: središnja pukotina i RNR motiv. Vezanje i procesiranje molekule pre-tRNA može se odvijati sa ili bez RnpA, ali je afinitet pre-tRNA te stopa procesiranja znatno manja u slučaju kada je RnpA odsutan.^{2,4,28,29}



Slika 4. Kristalna struktura RNP RNaze P bakterije *T. maritima* u kompleksu s tRNA. (A) Holoenzim-tRNA kompleks, C-domena(plavo) i S-domena(zeleno), RnpA(narančasto) te tRNA(crveno). (B) Topologija mjesta vezanja supstrata u katalitičkoj domeni (obojano kao pod A) uključujući i 5'-vodeći slijed (blijedo rozi štapići) vezan za RnpA te pretpostavljena vezna mjesta za metalne ione (roze kuglice). Prikazano je i stvaranje parova baza između GGU sekvence RNaze P i 3'RCCA sekvence tRNA(U256 – R73, G255-C74,G254-C75) koje je bitno za prepoznavanje pravilnog supstrata. (C) Topologija aktivnog mjesta (obojano kao pod A) uključujući i podjedinice aktivnog mjesta (ugljikovi atomi obojani plavo), produkt (G+1) (ugljikovi atomi obojani crveno), 5'-vodeći slijed (ugljikovi atomi obojani blijedo ružičasto) vezan za RnpA (narančasta površina), pretpostavljena veza s metalima (crne isprekidane linije) i pozicije pro-Rp (crvena kugla) i pro-Sp (plava kugla) kisika iz 5' fosfata produkta. Preuzeto i prilagođeno iz Klemm, B. P i sur. 2016 ²

3.1.2. Arhejska i eukariotska RNP RNaza P

Arhejske RNA komponente RNaze P većinom su najbližnije bakterijskoj RNA komponenti tipa A. Skupine *Methanococci* i *Archaeoglobus* kodiraju RNA komponentu RNaze P tipa M koja je identična bakterijskom tipu A, ali joj nedostaju P8, P16, P6 i P15 omče. RNA komponenta tipa P, koja sadrži samo katalitičku domenu, pronađena je u skupini *Pyrobaculum*.³⁰ Arhejske RNaze P sadrže najmanje četiri proteina, dok je peti prisutan kod arheja s RNA komponentom tipa M. Sve arhejske proteinske podjedinice homologne su s

RNaza P proteinima prisutnim kod kvasca i čovjeka, a nisu s bakterijskim proteinom. Uz pet proteina koji su homologni s arhejskim proteinima, jezgrina RNP RNaza P sadrži još četiri dodatna proteina u skupini gljiva ili minimalno još pet dodatnih proteina kod ostalih višestaničnih eukariota. Gljive sadrže dodatnu RNP RNazu P u mitohondrijima koja se sastoji od RNA komponente kodirane mitohondrijskom DNA te od velike proteinske komponente kodirane jezgrinom DNA. RNA komponenta RNaze P gljiva pokazuje djelomičnu sličnost s bakterijskom RNA, dok proteinska komponenta ne pokazuje nikakvu homologiju u sekvenci s drugim RNaza P proteinima.^{31,32} Ostali eukarioti imaju dvije RNaze P: jezgrinu koja je RNP i mitohondrijsku koja je PRORP.³³ Alga *Ostreococcus tauri* jedini je eukariot koji ima RNP oblik RNaze P u mitohondrijima, a PRORP u jezgri.³⁴ Retencija RNP RNaza P koje kodiraju organeli gljiva i nekih algi ukazuje da je ovaj oblik enzima bio prisutan i kod evolucijskih starijih eukariotskih skupina, ali da ga je s vremenom zamijenio PRORP oblik enzima u različitim kladama.²

Kod arheja, RNP je sačuvala većinu RNA komponente kao i kod bakterija, pogotovo C-domenu, ali je izgubio ključni element u S-domeni (peteljke P13-P14 kod RNaza tipa A i peteljku P10.2 kod RNaze tipa B) koji služi za održavanje stabilnog razmaka između dva vezna mjesta za pre-tRNA u bakterijskoj RNP RNazi P (Slika 3). Razmak između te dvije domene je bitan kako ne bi unutar molekule RNA došlo do stvaranja krivih interakcija te samim time krivog smatanja S-domene što bi onemogućilo prepoznavanje i vezanje pre-tRNA. Funkciju tog ključnog elementa u S-domeni kod arheja preuzeo je proteinski heterodimer RPP21-RPP29 koji služi kao most između S- i C-domene RNA komponente. Nadalje, P12 regija kod arheja i eukariota ima za razliku od bakterijske visoko varijabilan produžetak koji tvori heliks u obliku slova L za koji se veže protein RPP38. (POP5-RPP30)₂ heterotetramer specifično se asocira sa katalitičkom domenom RNA komponente kao i bakterijski protein RnpA. Dodatno dolazi do povezivanja proteinskih komponenti. (POP5-RPP30)₂ heterotetramer veže se s RPP21-RPP29 heterodimerom i RPP38, što stabilizira vezno mjesto za pre-tRNA u arhejskim RNazama P.²³

Kod eukariota dogodile su se dvije ključne promjene u strukturi C-domene RNA komponente RNaza P (Slika 3). Vezno mjesto za molekulu pre-tRNA, L₅₋₁₅ vezujuća struktura te peteljka P5 kompenzirane su kod eukariota s proteinom POP1 i njegovim osnovnim motivom (NTM). Za peteljku P3 kod eukariota veže se proteinski heterodimer RPP20-RPP25. Svih pet proteina prisutnih kod arheja imaju homologe kod eukariota (RPP21, RPP29, RPP30, RPP38, POP5). Protein POP5 i evolucijski mlađi protein POP8 imaju slične sekvence, ali različitu funkciju te su oba prisutna kod eukariota. Za razliku od bakterija i arheja, vezno mjesto za

vodeći slijed pre-tRNA kod eukariota nalazi se na proteinskoj podjedinici, a ne na RNA komponenti RNaze P.²³

Za razliku od bakterija jako mali broj arheja, a niti jedan eukariot ne može vršiti katalizu bez prisustva pomoćnih proteinskih podjedinica,^{34,35} što ukazuje na to da je RNP oblik RNaze P s manjom ovisnošću katalize o RNA komponenti bio evolucijski uspješniji.

3.2. Isključivo proteinski oblik RNaze P

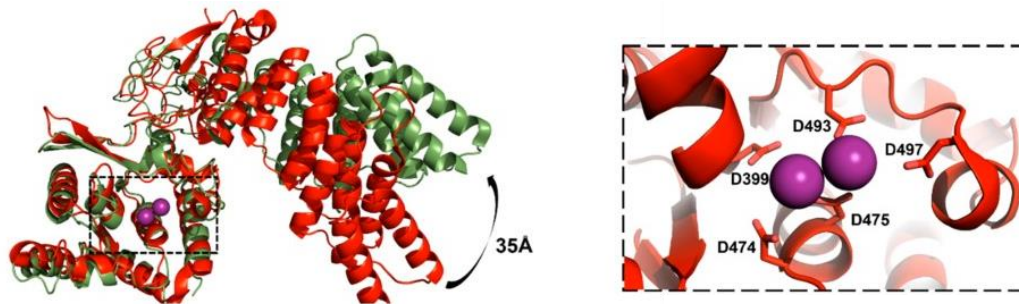
Nakon dva desetljeća istraživanja, 2008. godine otkriveno je da postoji oblik RNaze P koji ne ovisi o RNA već je isključivo proteinski enzim (PRORP) koji djeluje sam ili u kompleksu sa još dva proteina.³⁶ Filogenetičke analize proteina PRORP pokazale su da je ovaj oblik prisutan u četiri od pet eukariotskih supergrupa, a jedina supergrupa u kojoj ovaj oblik nije prisutan su Amoebozoa. Zbog tako velike distribucije PRORP oblika u domeni eukariota moguće je da se eukariotski PRORP oblik pojavio u prvim eukariotima prije divergencije supergrupa. PRORP oblik RNaze P prisutan je i kod arheja i bakterija, no po svojoj sekvenci i strukturi ne pokazuje homologiju s eukariotskim PRORP oblikom.

3.2.1. Eukariotska PRORP

Alge, biljke i tripanosoma sadrže enzime PRORP koji se sastoje od samo jedne proteinske podjedinice dok ostali višestanični eukarioti imaju PRORP enzime koji se sastoje od tri proteinske podjedinice.³⁷

A.thaliana ima dva tipa enzima PRORP: PRORP1 i PRORP2. *AtPRORP1* je monomerni protein koji se nalazi u kloroplastima i mitohondrijima te sadrži tri domene: metalonukleaznu domenu NYN (N4BP1, eng. *YacP-like Nuclease*), bipartitnu domenu za koju se veže cink i PPR domenu (eng. *pentatricopeptide repeat*) za koju se veže pre-tRNA. Aktivno mjesto *AtPRORP1* nalazi se u NYN domeni i sadrži četiri aspartata (*AtPRORP1* Asp 399, 474, 475 i 493) koja su u potpunosti očuvana u svim eukariotskim PRORP te peti aspartat (*AtPRORP1* Asp 497) koji nije očuvan u svim višestaničnim eukariotskim homolozima (Slika 5).³⁸ *AtPRORP2* je dimerni protein koji se nalazi u jezgri te sadrži tri glavne strukturne domene koje pokazuju visok stupanj homologije s domenama proteina *AtPRORP1* (Slika 5). Metalonukleazna domena NYN s aktivnim mjestom nalazi se na jednoj podjedinici *AtPRORP2* i sadrži pet očuvanih aspartata (*AtPRORP2* Asp 343, 421, 422, 440, 444). Za aktivno mjesto u domeni NYN veže se druga podjedinica proteina *AtPRORP2* preko lizina (*AtPRORP2* Lys 42). Većina razlika između *AtPRORP1* i *AtPRORP2* nalazi se u regijama u obliku peteljke koje

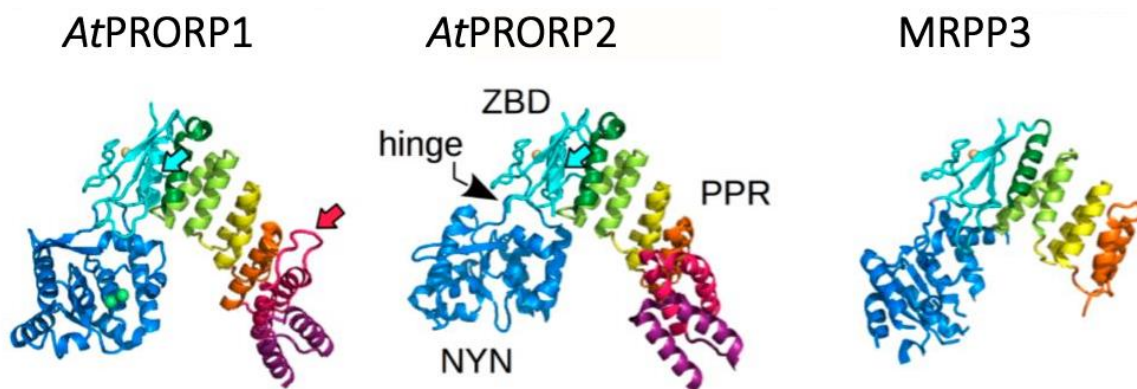
povezuju visoko očuvane strukturne domene. Kod *AtPRORP2* domene PPR i NYN okrenute jedna od druge dok su kod *AtPRORP1* domene PPR i NYN okrenute jedna prema drugoj zbog čega *AtPRORP2* ostvaruje otvoreniju konformaciju.³⁹



Slika 5 Kristalna struktura *AtPRORP1* i *AtPRORP2* te aktivnog mjesta *AtPRORP1*. **Lijevo:** 3D poravnanje *AtPRORP1* i *AtPRORP2* preko aktivnog mjesta u domeni NYN (pravokutnik označen isprekidanim linijama). *AtPRORP1* (crveno) je prikazan s metalonukleaznom domenom NYN za koju su vezana dva iona mangana (ljubičaste kugle). *AtPRORP2* (zeleno) ostvaruje otvoreniju konformaciju, što rezultira da je pozicija prvog PPR heliksa odmaknuta za ~35 Å u odnosu na prvi PPR heliks kod *AtPRORP1*. **Desno:** Aktivno mjesto *AtPRORP1* sadrži četiri očuvana aspartata i jedan parcijalno očuvani aspartat (štipači). Preuzeto i prilagođeno iz Klemm, B. P i sur. 2016²

Mitochondriji čovjeka imaju najbolje istraženi PRORP kompleks koji se sastoji od tri proteina: MRPP1, MRPP2 i MRPP3 (eng. *mitochondrial RNase P protein*). Za procesiranje 5'-kraja pre-tRNA zadužen je MRPP3, NYN metalonukleaza ovisna o Mg^{2+} . Ljudski mitohondrijski PRORP kompleks ne pokazuje nikakvu homologiju s proteinima u citosolnim RNP RNazama P, a MRPP3 je funkcionalni homolog *AtPRORP1* i *AtPRORP2* proteina. Karakteristično za MRPP3 i njegove homologe je da zauzimaju konformaciju u obliku slova „V“ (Slika 6).^{36,40} MRPP1 ima tRNA metiltransferaznu aktivnost i sudjeluje u vezanju pre-tRNA dok MRPP2 pomaže u vezanju pre-tRNA za MRPP1. MRPP1 i MRPP2 stvaraju kompleks interakcijama preko N i MT(metil-transferazne) domene MRPP1. Sugerirano je da postoje dva moguća aranžmana podjedinica. Jedan u kojem se dva MRPP1 monomera nalaze simetrično s distalne strane MRPP2 tetramera, te drugi kod kojeg su jedan MRPP1 homodimer i MRPP2 homotetramer povezani asimetrično. Pravi način vezanja MRPP1 i MRPP2 nije još u potpunosti razriješen. MRPP1-MRPP2-MRPP3 kompleks formira se samo u prisutnosti pre-tRNA te omogućava procesiranje 5'-kraja tRNA. Bez stvaranja interakcije s MRPP1-MRPP2

kompleksom, MRPP3 je nefunkcionalna metalonukleaza jer ne može vezati i aktivirati supstrat za procesiranje.⁴¹



Slika 6. 3D strukture tri oblika PRORP. Lijevo se nalazi AtPRORP1 s dva vezana Mn^{2+} iona (zelene kuglice) (PDB 4G24), u sredini se nalazi AtPRORP2 (PDB 5FT9), a desno se nalazi MRPP3 (PDB 4XGL). Svi PRORP enzimi sadrže N-terminalnu pentatrikopeptidinu ponavljajuću domenu (PPR) s pet različitih oblika PPR (označeni ljubičasto, crveno, narančasto, žuto i zeleno), C-terminalnu N4BP1, YacP nukleaznu (NYN) katalitičku domenu (označena tamno plavo). Ove dvije domene povezane su preko bipartitne cink vezujuće domene (ZBD, označeno svijetlo plavo) koje koordiniraju Zn^{2+} ion (zlatna kuglica). Preuzeto i prilagođeno iz Schelcher C. i sur. 2016.⁴²

3.2.2. Arhejska i bakterijska PRORP

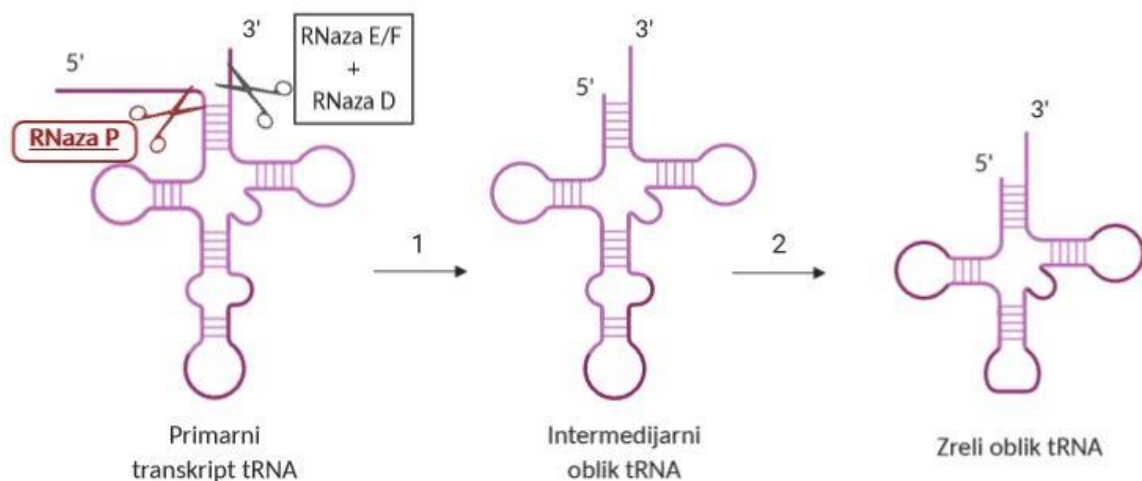
Smatralo se da bakterije i arheje sadrže isključivo RNP oblik RNaze P, no nedavno je otkriven PRORP oblik u bakteriji *Aquifex aeolicus*. Sekvenca koja kodira ovaj protein pronađena je u bakterijskim i arhejskim genomima, no u niti jednom eukariotu te značajno se razlikuje od sekvenci koje kodiraju za PRORP oblike prisutne kod eukariota. Protein kodiran ovom sekvencom nazvan je HARP (eng. *Homologs of Aquifex RNase P*). HARP kodira još malen broj vrsta iz nekolicine bakterijskih rodova uz Aquificae, a većina rodova s HARP proteinom uz njega ima i RnpA što ukazuje na to da za normalno funkcioniranje stanice uz HARP mora postojati i RNP oblik RNaze P. Iznimka je pronađena kod Aquificae i Nitrospirae gdje neke vrste kodiraju samo HARP. Kod arheja zasad nije pronađena niti jedna vrsta koja kodira samo HARP bez ko-pojave jednog ili više RNaza P proteina. U različitim razredima arheja HARP ima dosta nejednoliku pojavnost, prisutan je u skoro svim pripadnicima grupe Euryarchaeota, no u grupama TACK, DPANN i Asgard se ne pojavljuje. Ovakva distribucija konzistentna je s hipotezom po kojoj je HARP sekvenca prešla u arhejski genom horizontalnim transferom gena. Postoji i razmišljanje kako je HARP izvorno nastao kao rezultat otrov-protuotrov sustava.^{6,17}

HARP je 23kDa velik protein čija struktura još nije razriješena. Bioinformatičke analize predviđaju ograničenu sličnost u sekvenci pa i samim time u strukturi između Aq_880 (PRORP enzim pronađen u bakteriji *Aquifex aeolicus*) i NYN metalonukleazne domene eukariotskih PRORP enzima. Predviđena je i mjestimična sličnost s PPR RNA-vezujućom domenom i centralnom domenom PRORP eukariotskih enzima. Parcijalno poravnanje glavnog dijela metalonukleazne domene i Aq_880 sugerira da bi bakterijski aspartati (Aq_880 Asp 138, 142 i 160) mogli biti funkcionalni ekvivalenti *AtPRORP1* aspartatima (*AtPRORP1* Asp 399, 475, 493) prisutnim u katalitičkom centru.^{6,17}

4. Katalitička moć RNaze P

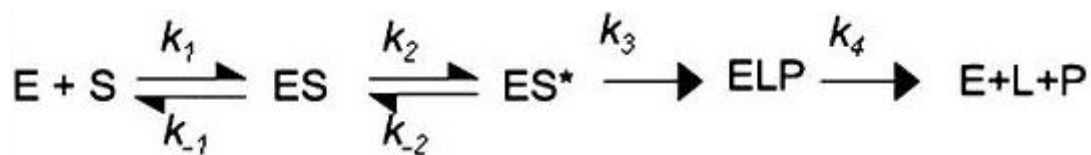
4.1. Mehanizam procesiranja pre-tRNA

RNaza P su metal-ovisne endonukleaze tj. hidrolaze koje kataliziraju mjesno specifičnu hidrolizu fosfodiesterske veze na 5'-vodećem slijedu pre-tRNA (Slika 7). Istraživanje mehanizama katalize RNaza P pružila su uvid u raznolike oblike enzima sposobnih katalizirati ovu temeljnu biološku reakciju na identičan način putem općenitog modela katalize baziranog na dva metalna iona.



Slika 7. Procesiranje tRNA. U prvom koraku procesiranja dolazi do uređivanja 5'-kraja (RNaza P), 3'-kraja (RNaza E/F i D), modifikacije baza te dodatka CCA sekvence na 3'-kraj. U drugom koraku dolazi do izrezivanja introna u antikodonskoj petlji.

Istraživanja na RNP RNazi P bakterije *B. subtilis* ukazuju da se mehanizam katalize odvija u četiri koraka (Slika 8): (1) RNaza P (E) holoenzim veže pre-tRNA (S) brzinom koja je u principu limitirana brzinom difuzije (između 10^6 i 10^7 $M^{-1}sec^{-1}$) i stvara kompleks enzim-supstrat (ES); (2) Početni ES kompleks prolazi kroz unimolekularni izomerizacijski korak u katalitički kompetentnu konformaciju (ES*); (3) Hidroliza fosfodiesterske veze 5'-kraja pre-tRNA koja se nalazi u ovom ES* kompleksu rezultira zreloom tRNA na 5'-vodećem slijedu; (4) produkti disociraju sa RNaze P. Disocijacija produkta je korak koji određuje ukupnu brzinu reakcije (eng. *rate-limiting step*).⁴³⁻⁴⁵

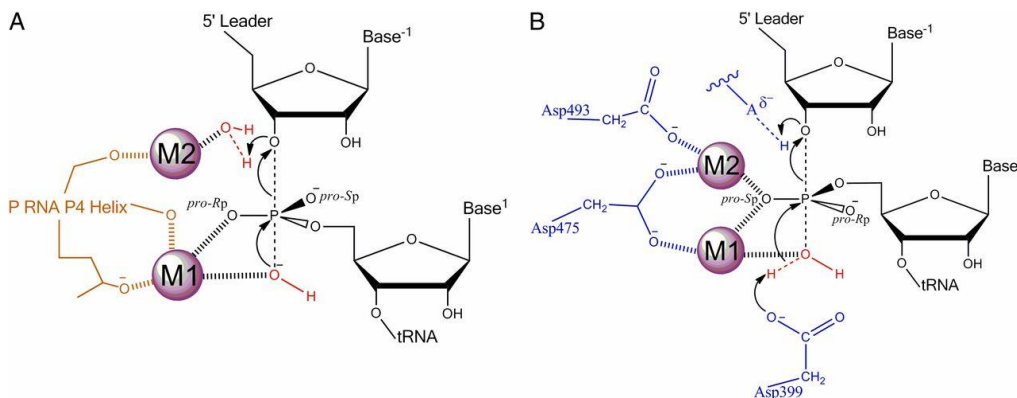


Slika 8. Minimalni kinetički mehanizam katalize bakterijskom RNP RNazom P. Prvi korak je bimolekularni i ovisi o koncentraciji enzima (E) i supstrata (S). Vežanje, konformacijska promjena i hidroliza supstrata ovise o koncentraciji iona. Kod hidrolize bitnu ulogu ima i pH.

Konformacijska promjena ima nekoliko potencijalnih uloga u katalizi. Promjena konformacije može biti korekcijski korak u kojem RNaza P razlučuje je li došlo do vežanja pravilnog (pre-tRNA) ili pogrešnog supstrata.⁴⁴ U ovom koraku dolazi do olakšanog odmotavanja 5'- i 3'- kraja pre-tRNA te do interakcije N(-1) nukleotidne baze 5'-vodećeg slijeda pre-tRNA s visoko očuvanim adenozinom u RNA komponenti RNaze P što povećava vjernost pre-tRNA procesiranja. 5'-vodeći slijed pomiče se bliže sučelju RNA i proteina te se tako, tijekom ES-ES* tranzicije, pozicionira u aktivno mjesto RNP-a. U ES* konformaciji, bočni ogranci centralne udubine proteina RnpA stvaraju interakcije s 5'-vodećim slijedom pre-tRNA između N(-4) i N(-7) nukleotida te tako precizno pozicioniraju supstrat za katalizu. Tranzicija ES-ES* također omogućava da C- i S-domene RNA komponente RNP-a pravilno pozicioniraju svoje funkcionalne grupe i ione u aktivno mjesto RNP-a.^{44,46,47}

Općeniti katalitički model koji se bazira na dva metalna iona predložen je za većinu nukleaza i polimeraza prije 20 godina i kod raznih RNP oblika RNaze P je višestruko dokazan kao točan (Slika 9). U ovom modelu metal 1 se pozicionira tako da može deprotonirati vodu i aktivirati ju za nukleofilni napad, dok metal 2 stabilizira prijelazno stanje i koordinira molekulu vode koja protonira 3'O izlazeće skupine. Oba metalna iona stabiliziraju naboj koji nastaje u prijelaznom stanju. Temeljno sličan mehanizam postoji i kod PRORP oblika RNaze P (Slika

9). Aspartat u aktivnom mjestu PRORP RNaze P ima ulogu baze i deprotonira vodu koja je koordinirana metalom 1 te ju tako aktivira za nukleofilni napad. Oksoanionsko prijelazno stanje stabilizirano je pomoću oba metalna iona koji koordiniraju pro-Sp kisik fosfodieterske veze koja se hidrolizira. Opća kiselina (npr. histidinski bočni ogranak kod *AtPRORP1*), koja se nalazi u aktivnom mjestu, protonira i stabilizira izlazeću skupinu.^{29, 38, 48} Za razliku od RNP RNaza P, aktivno mjesto PRORP ne dolazi u kontakt s pro-Rp kisikom fosfata na mjestu procesiranja pre-tRNA dok pro-Sp kisik na mjestu procesiranja pre-tRNA dolazi u interakciju s metalnim ionom kao što je slučaj kod drugih metalonukelaza.^{48, 49} Razlika u koordinaciji metala na mjestu cijepanja fosfodieterske veze može se objasniti promijenjenim stereokemijskim zahtjevima za koordinaciju pro-Rp i pro-Sp atoma kisika. Katalitička efikasnost oblika PRORP u usporedbi s oblikom RNP u katalizi procesiranja pre-tRNA je oko 1000 puta manja što je nekonzistentno s hipotezom RNA svijeta po kojoj su proteinski enzimi evoluirali zato jer su imali napredniji i bolji katalitički mehanizam za razliku od njihovih RNA predaka.^{29, 48, 50, 51}



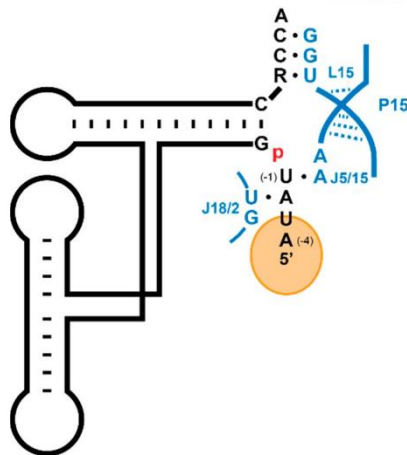
Slika 9. Usporedba mehanizma katalize RNP i isključivo proteinskog oblika RNaze P. (A) Mehaniizam katalize RNP oblika RNaze P. Vezani metali (M1 i M2) koordinirani su atomima kisika iz fosfodieterske veze koja se cijepa i atomima kisika nukleotidnih baza RNA komponente. Voda vezana za M1 je nukleofil u reakciji. M1 koordinira i pro-Rp kisik fosfatne veze koja se cijepa. M2 pozicionira molekulu vode koja protonira 3'O izlazeće skupine. **(B)** Mehaniizam katalize PRORP oblika RNaze P. Aspartat u aktivnom mjestu ima ulogu baze i katalizira deprotonaciju vode vezane za metal (M1) te tako aktivira vodu za nukleofilni napad. Pro-Sp kisik fosfodieterske veze koja se hidrolizira koordiniran je s oba metalna iona što stabilizira oksianionsko prijelazno stanje. Opća kiselina u aktivnom mjestu protonira i stabilizira izlazeću skupinu. Preuzeto i prilagođeno iz Howard M. J. i sur. 2012³⁸

4.2. Prepoznavanje pre-tRNA od strane RNaze P

Većina tRNA iz svih domena života ima isti oblik sekundarne i tercijarne strukture.⁵² Mitohondriji višestaničnih eukariota (lat. *Metazoa*) imaju velik broj tRNA koje odstupaju od kanonskog oblika što može biti razlog zašto su u ljudskim mitohondrijima evoluirale dodatne proteinske podjedinice za RNazu P.⁵³

4.2.1. Prepoznavanje RNP oblikom RNaze P

U bakterijskim RNP RNazama P za prepoznavanje supstrata potrebni su i protein RnpA i RNA komponenta koji se specifično vežu za 5'- vodeći slijed i 3'RCCA motiv molekule pre-tRNA (Slika 10). Afinitet holoenzima za pre-tRNA varira s duljinom vodećeg lanca od 2- do 5-nukleotida. RnpA povećava afinitet vezanja pre-tRNA i katalizu tako što ostvaruje interakciju s 5'- vodećim slijedom pre-tRNA. Ova interakcija povećava afinitet i za ione Mg^{2+} što rezultira jednoličnim vezanjem raznih pre-tRNA supstrata. Tijelo pre-tRNA se veže s malim afinitetom, dok je za 5'-vodeći slijed pre-tRNA afinitet vezanja za bakterijski holoenzim velik.^{54,55} 3'RCCA motiv molekule pre-tRNA komplementarno se sparuje s GGU nukleotidnom sekvencom u omći P15 RNA komponente RNaze P što rezultira povećanim afinitetom RNA komponente za pre-tRNA. 3' RCCA interakcijski motiv nedostaje u arhejskoj RNA komponenti tipa M i eukariotskoj RNA komponenti što se slaže s činjenicom da u genomu te skupine arheja i eukariotima nema koda za 3' RCCA motiv u pre-tRNA genima.¹⁷ Bakterijske RNaze P preferiraju uracil na poziciji N(-1) na 5'-vodećem slijedu pre-tRNA. Smatra se da dolazi do interakcije uracila s A213 u J5/15 dijelu RNA komponente.^{54,56} Bioinformatičke analize pre-tRNA gena 161 bakterijske vrste naznačuju da ih većina ima statistički značajnu preferencu za određene nukleotide u 5'-vodećem slijedu. Preference za određene nukleotide povećavaju se što su bliže mjestu hidrolize fosfodieterske veze i vrsno su specifične.⁵⁵ Još jedan važan faktor u prepoznavanju pre-tRNA i odabiru mjesta cijepanja u bakterijskoj RNazi P je interakcija između D-T ψ C ruke pre-tRNA i CRII-III regije RNA komponente RNaze P.²⁹



Slika 10. Interakcije između nukleotidnih sekvenci pre-tRNA i bakterijske RNaze P. 3' RCCA motiv pre-tRNA (označena crno) komplementarno se sparuje s GGU sekvencom RNA komponente (označeno plavo). Uracil na poziciji N(-1) od mjesta cijepanja (crveno p) fosfodiesterske veze u pre-tRNA spaja se s aspartatom u J5/15 dijelu RNA komponente RNaze P. Protein RnpA (označeno žuto) ostvaruje interakciju s 5'-vodećim slijedom pre-tRNA. Prezeto i prilagođeno iz Klemm, B. P i sur. 2016 ²

Kod arhejskih RNP RNaza P, proteinske podjedinice i divalentni metalni ioni utječu na vjernost procesiranja i katalitičku efikasnost. Istraživanja na RNazi P kod *P. furiosus* pokazala da proteinski dimeri RPP21–RPP29 i POP5–RPP30 omogućuju pravilne interakcije holoenzima s molekulom pre-tRNA.⁵⁷

Jezgrina RNP RNaza P kod čovjeka za prepoznavanje pre-tRNA zahtjeva povezničku sekvencu od barem jednog nukleotida između akceptorske peteljke i T ψ C ruke u molekuli pre-tRNA. Pre-tRNA kojima nedostaje ili antikodonska peteljka ili većina varijabilne regije mogu biti procesirane pomoću jezgrine RNaze P, pre-tRNA kojima nedostaju obje ove regije neprepoznatljive su RNazi P. Ova činjenica ukazuje na to da je moguće da RNP RNaza P čovjeka drugačije prepoznaje tercijarnu strukturu pre-tRNA ili da se pre-tRNA kojoj nedostaje antikodonska peteljka i većina varijabilne regije nepravilno smata zbog čega je RNaza P ne može prepoznati. Dodatak ekstra parova baza u akceptorsku peteljku i T peteljku dovodi do pogrešnog cijepanja supstrata s jezgrinom RNP RNazom P čovjeka, dok bakterijska RNaza P ne pokazuje odstupanja u pravilnom procesiranju takvih supstrata što bi moglo značiti da eukariotska RNaza P ima stroži mehanizam prepoznavanja mjesta cijepanja.⁵⁸

4.2.2. Prepoznavanje PRORP oblikom RNaze P

Većina biljnih tRNA ima kanonsku sekundarnu i tercijarnu strukturu te biljne monomerne PRORP mogu katalizirati procesiranje pre-tRNA iz raznih drugih organizama. *AtPRORP2* cijepa pre-tRNA^{Gly} iz bakterije *T. thermophilus* pri 28 °C, ali ne i pri 37 °C što sugerira da strukturna dinamika ili pre-tRNA ili *AtPRORP2* ima bitnu ulogu u prepoznavanju supstrata.⁴⁹ *AtPRORP1* i *AtPRORP2* stvaraju interakcije s nukleotidima na poziciji N(-1) i N(-2) od mjesta cijepanja fosfodiesterske veze na 5'-vodećem slijedu, ali ne stvaraju interakcije s nukleotidima koji se nalaze na udaljenijim pozicijama od mjesta cijepanja niti s 3' RCCA motivom. Najbitnija mjesta prepoznavanja pre-tRNA od strane PRORP nalaze se u unutrašnjem tijelu molekule pre-tRNA.² PPR domena PRORP služi za prepoznavanje supstrata.³⁸ Mutacijska analiza enzima PRORP1 i PRORP3 pokazala je da N136 u PPR2 i T180 u PPR3 te R145 u PPR4 sudjeluju u prepoznavanju supstrata. Međutim, nije još razriješeno kako te podjedinice stupaju u interakciju. Postoji pretpostavka da PPR domene u PRORP imaju strategiju prepoznavanja supstrata identičnu kao i proteini s PPR domenom koji prepoznaju i vežu jednolančanu RNA.^{2, 59, 60}

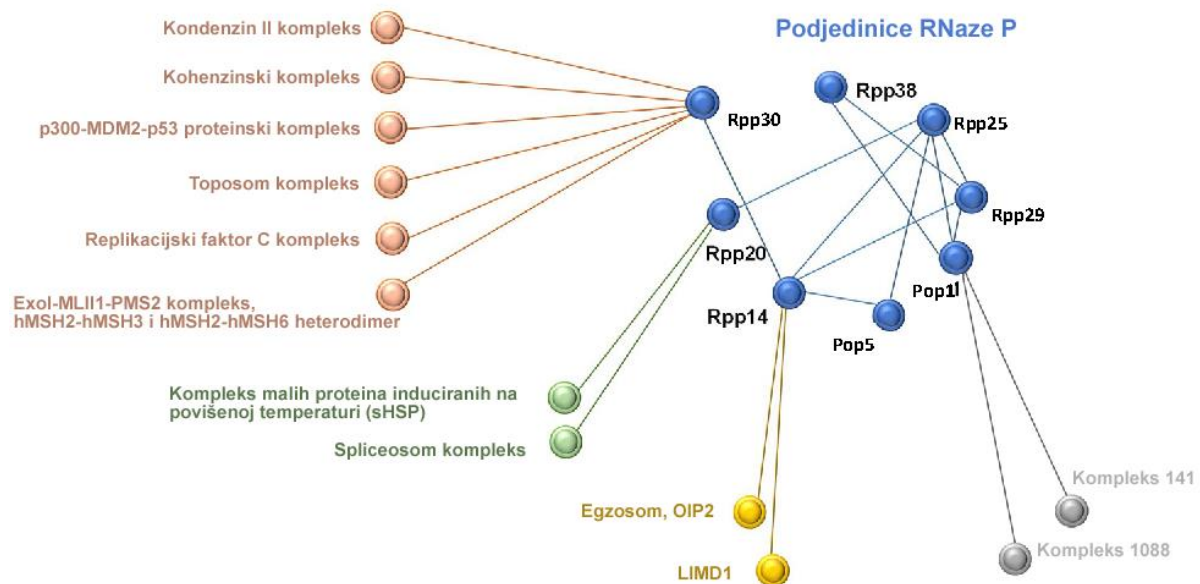
Mitohondrijska PRORP čovjeka ima sposobnost katalize kanonskih i nekanonskih oblika molekule tRNA koje se nalaze u mitohondrijima čovjeka (mt-tRNA). MRPP1 i MRPP2 imaju esencijalnu ulogu u katalitičkoj aktivnosti enzima te u prepoznavanju mt-tRNA. MRPP1 i MRPP2 stvaraju kompleks koji omogućava MRPP1 da prepozna i veže mt-tRNA. Pretpostavlja se da MRPP2 pomaže vezanju mt-tRNA za MRPP1 tako što stabilizira katalitički važne strukturne elemente MRPP1 (npr. N-domena za koju se pokazano da je bitna za vezanje pre-tRNA) te remodelira katalitičke komponente metil-transferazne domene MRPP1.⁴¹

5. Uloga RNaza P u drugim staničnim procesima

U zadnjih 10 godina istraživanja su otkrila da RNaza P ne sudjeluje samo u procesiranju 5'- vodećeg slijeda pre-tRNA već da ona zapravo sudjeluje u raznim procesima važnim za pravilno funkcioniranje stanice (Slika 11).

S jedne strane kod bakterija RNaza P dodatno procesira i pre-4.5S RNA, prekursorsku-transportnu-glasničku RNA (pre-tmRNA), prekursorsku-glasničku RNA(pre-mRNA), glasničku RNA (mRNA), riboprekidače (eng. *riboswitch*), laktoza operon te nekoliko fagom-induciranih regulatornih RNA molekula. Proteinske podjedinice RNaze P povezane su sa strukturom kromatina te njegovom funkcijom. U ljudskim stanicama, razni proteini jezgrine RNP RNaze P vežu se za rRNA i male nekodirajuće RNA gene koje transkribira RNA

polimeraza I (Pol I) i RNA polimeraza III (Pol III). Inicijacijski kompleks Pol III koji sudjeluje u transkripciji 5S rRNA sadrži proteinske podjedinice RNP RNaze P.⁶¹ RPP21, RPP29 i POP1, podjedinice ljudske RNaze P, sprječavaju uklanjanje histona H3.3 iz nukleosoma te tako potiču utišavanje transkripcije gena.⁶² Kod vinske mušice otkriveno je da jezgrina RNaza P sudjeluje u ekspresiji genskih klastera koji kodiraju tRNA i piRNA (eng. *Piwi-interacting RNA*).³ Varijanta ljudske RNaze P koja ima RPP1, RPP29 i RPPH1 RNA komponentu, ali nema RPP14, RPP25 i RPP38 promovira popravak dvolančanih lomova molekule DNA putem homologne rekombinacije.⁶³ Nadalje, dio proteinskih podjedinica nalazi se u više različitih RNP-a. Tri kvaščeve proteinske podjedinice, POP1, POP6 i POP7 (homolozi ljudskih podjedinica: POP1, RPP25 i RPP20), esencijalne su komponente telomeraze, enzima koji reverznom transkripcijom produljuje 3'-kraj molekule DNA te tako sprječava njeno skraćivanje.⁶⁴ Kod arheja RPP38 proteinska podjedinica pomaže u remodeliranju H/ACA i C/D box sekvenci snoRNA (eng. *small nucleolar RNA*) kako bi se bolje vezala za supstrat.⁶⁵ Kod eukariota, jezgrina RNaza P dijeli komponente sa još jednim esencijalnim rubonukleoproteinom, jezgrinom RNazom MRP. RNaza MRP nalazi se u većini eukariota te katalizira procesiranje RNA molekula uključujući i rRNA.^{66,67}



Slika 11. Predložena protein-protein interakcijska mapa proteinskih podjedinica čovjekove RNaze P s drugim proteinima i kompleksima. Preuzeti i prilagođeno iz Jarrous N. 2017.⁶⁸

6. Zaključak

RNaza P enzimi predstavljaju zanimljiv i jedinstven slučaj konvergentne evolucije enzima koji ima ili RNA- ili protein-bazirano aktivno mjesto katalize. Iako imaju različito porijeklo RNP i PRORP oblik RNaze P dijele zajedničke karakteristike u mehanizmu katalize i prepoznavanja pre-tRNA. Mogući razlog sličnosti u katalizi ova dva oblika je što supstrat, molekula tRNA, u svim živim organizmima poprima identičan oblik djeteline sa mnogim očuvanim dijelovima sekvence.

Po hipotezi RNA svijeta većina ribozimskih katalizatora je s vremenom u stanici zamijenjena s proteinskim katalizatorom jer su se oni evolucijski pokazali kao efikasniji i bolji u katalizi reakcija važnih za održavanje života. Zbog prisutnosti oba oblika RNaze P u svim domenama života, neki znanstvenici smatraju da zapravo RNaza P predstavlja primjer enzima kod kojeg se još nije dogodio potpuni prijelaz na isključivo proteinski oblik enzima već da je RNaza P sad u „prijelaznom stanju“. Međutim, svi eksperimentalni dokazi za funkcionalnu jednakost ova dva oblika RNaze P sugeriraju da sama sposobnost kataliziranja reakcije ili veličina i kompleksnost određenog oblika enzima nisu dovoljan razlog zašto bi se samo jedan oblik zadržao u organelima i organizmima. Ovakav ishod vjerojatno nije nastao slučajno. RNA komponenta i proteinske podjedinice RNP oblika RNaze P ne sudjeluju samo u procesiranju 5'-vodećeg slijeda pre-tRNA molekula već imaju i bitnu funkcionalnu ulogu u drugim staničnim procesima zbog čega bi eventualni gubitak bilo koje komponente RNP oblika RNaze P uvelike negativno utjecao na preživljavanje bakterijskih, arhejskih i eukariotskih stanica.

Struktura jezgre aktivnog mjesta RNA komponente RNP oblika RNaze P visoko je očuvana u svim domenama života te stoga možemo pretpostaviti da porijeklo RNP oblika RNaze P datira sve do zadnjeg univerzalnog zajedničkog pretka, LUCA (eng. *Last Universal Common Ancestor*), tj. RNP oblik RNaze P je vjerojatno ancestralni. Nedavno otkriće HARP-a nije opovrgnulo ovu hipotezu jer se PRORP oblici RNaze P drastično razlikuju u domeni eukariota i domeni bakterija i arheja. Eukarioti, iako evolucijski mlađa skupina organizama nastala endosimbiozom arheja i bakterija,⁶⁹ nisu naslijedili PRORP oblik RNaze P od svojih prokariotskih predaka već su se ova dva isključivo proteinska oblika razvila neovisno jedan o drugome konvergentnom evolucijom.

Sve tri domene života veoma su opsežne i svaka novo otkrivena molekula sa specifičnom funkcijom u stanici stvara veliku zagonetku u razrješenju pitanja njenog porijekla i evolucijskog razvoja. RNaza P je specifičan primjer takvih molekula i konačni odgovor na

pitanje kako je točno izgledala evolucija ovog enzima i koje sve funkcije ovaj enzim ima u raznim domenama života zahtjeva daljnja istraživanja svih oblika ovog enzima, a pogotovo nedavno otkrivenog PRORP oblika HARP.

7. Literatura

1. Voet, D., Voet, J. G. (2010). Biochemistry, 4th edition, New York: John Wiley and Sons, Inc., pp. 469
2. Klemm, B. P., Wu, N., Chen, Y., Liu, X., Kaitany, K. J., Howard, M. J., & Fierke, C. A. (2016). The Diversity of Ribonuclease P: Protein and RNA Catalysts with Analogous Biological Functions. *Biomolecules*, **6**(2), 27.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). Molecular biology of the cell, 5th edition, New York: Garland Science. Crick FH 1968. The origin of the genetic code. *J Mol Biol* **38**: pp. 400, 367–379
4. Frank, D. N., Pace, N.R. (1998). Ribonuclease P: Unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu Rev Biochem.*; **67**:153–180.
5. Hopper, A. K., & Huang, H.Y. (2015). Quality Control Pathways for Nucleus-Encoded Eukaryotic tRNA Biosynthesis and Subcellular Trafficking. *Molecular and cellular biology*, **35**(12), 2052–2058.
6. Nickel, A. I., Wäber, N. B., Gößringer, M., Lechner, M., Linne, U., Toth, U., Rossmann, W., Hartmann, R. K. (2017). Minimal and RNA-free RNase P in *Aquifex aeolicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**(42), 11121–11126.
7. Woese, C. R., Dugre, D. H., Saxinger, W. C., & Dugre, S. A. (1966). The molecular basis for the genetic code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **55**(4), 966–974
8. Orgel, L. E. (1968). Evolution of the genetic apparatus. *J. Mol. Biol* **38**: 381–393
9. Crick, F. H. C. (1968). The origin of the genetic code, *J. Mol. Biol.*, **38** pp. 367-379
10. Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., Cech, T. R. (1982). Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**: 147–157.
11. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace N., Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849–857.
12. Sharp, P.A. (1985). On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* **42**: 397–400.
13. Pace, N.R., Marsh, T.L. (1985). RNA catalysis and the origin of life. *Orig Life Evol Biosph* **16**: 97–116.
14. Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**: 618.

15. Nelson DL, Cox MM (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th edition, New York: W. H. Freeman and Company, pp. 39-41
16. Gopalan, V., Jarrous, N., & Krasilnikov, A. S. (2018). Chance and necessity in the evolution of RNase P. *RNA* (New York, N.Y.), **24**(1), 1–5.
17. Daniels, C. J., Lai, L. B., Chen, T. H., & Gopalan, V. (2019). Both kinds of RNase P in all domains of life: surprises galore. *RNA* (New York, N.Y.), **25**(3), 286–291
18. Omelchenko, M. V., Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. (2010). Non-homologous isofunctional enzymes: a systematic analysis of alternative solutions in enzyme evolution. *Biol Direct* **5**: 31
19. Randau, L., Schröder, I., Soll, D. (2008) Life without RNase P. *Nature*; **453**:120–123.
20. Howard, M. J., Liu, X., Lim, W. H., Klemm, B. P., Fierke, C. A., Koutmos, M., & Engelke, D. R. (2013). RNase P enzymes: divergent scaffolds for a conserved biological reaction. *RNA biology*, **10**(6), 909–914.
21. Altman, S. (2007). A view of RNase P. *Mol Biosyst* **3**: 604–607.
22. Lai, L. B., Vioque, A., Kirsebom, L. A., Gopalan, V. (2010). Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects. *FEBS Lett* **584**: 287–296.
23. Wu, J.D., Niu, S., Tan, M., Huang, C., & Lei, M. (2018). Cryo-EM Structure of the Human Ribonuclease P Holoenzyme. *Cell*, **175**, 1393-1404.
24. Kole, R., Altman, S. (1981). Properties of purified Ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry*; **20**:1902–1906.
25. Haas, E.S., Brown, J.W. (1998). Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res.*; **26**:4093–4099.
26. Hsieh, J., Andrews, A. J., Fierke, C. A. (2004). Roles of protein subunits in RNA-protein complexes: Lessons from Ribonuclease P. *Biopolymers.*; **73**:79–89.
27. Waugh, D. S., & Pace, N. R. (1990). Complementation of an RNase P RNA (*rnpB*) gene deletion in *Escherichia coli* by homologous genes from distantly related eubacteria. *Journal of bacteriology*, **172**(11), 6316–6322.
28. Spitzfaden, C., Nicholson, N., Jones, J. J., Guth, S., Lehr, R., Prescott, C. D., Hegg, L. A., Eggleston D.S. (2000). The structure of Ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *J. Mol. Biol.*; **295**:105–115.
29. Reiter, N. J., Osterman, A., Torres-Larios, A., Swinger, K. K., Pan, T., & Mondragón, A. (2010). Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*, **468**(7325), 784–789.
30. Harris, J. K., Haas, E. S., Williams, D., Frank, D.N., Brown, J.W. (2001). New insight into RNase P RNA structure from comparative analysis of the archaeal RNA. *RNA.*; **7**:220–232

31. Chamberlain, J. R., Lee, Y., Lane, W.S., Engelke, D. R. (1998). Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.*; **12**:1678–1690
32. Morales, M. J., Dang, Y. L., Lou, Y. C., Sulo, P., Martin, N. C. (1992). A 105-kDa protein is required for yeast mitochondrial RNase P activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; **89**:9875–9879.
33. Walker, S. C., Engelke, D. R. (2006). Ribonuclease P: The evolution of an ancient RNA enzyme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*; **41**:77–102.
34. Lai, L.B., Bernal-Bayard, P., Mohannath, G., Lai, S. M.; Gopalan, V.; Vioque, A (2011). A functional RNase P protein subunit of bacterial origin in some eukaryotes. *Mol. Genet. Genomics* ;**286**:359–369.
35. Pannucci, J. A., Haas, E. S., Hall, T. A., Harris, J. K., & Brown, J. W. (1999). RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(14), 7803–7808.
36. Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K. L., Gerner, C., Rossmannith, W. (2008). RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* **135**: 462–474.
37. Lechner, M., Rossmannith, W., Hartmann, R. K., Thölken, C., Gutmann, B., Giegé, P., Gobert, A. (2015). Distribution of ribonucleoprotein and protein-only RNase P in Eukarya. *Mol. Biol. Evol.*; **32**:3186–3193.
38. Howard, M. J., Lim, W. H., Fierke, C. A., Koutmos, M. (2012). Mitochondrial Ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; **109**:16149–16154.
39. Karasik, A., Shanmuganathan, A., Howard, M. J., Fierke, C. A., Koutmos, M. (2015) Nuclear protein-only Ribonuclease P2 structure and biochemical characterization provide insight into the conserved properties of tRNA 5' end processing enzymes. *J. Mol. Biol.*; **428**:26–40.
40. Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Gössringer, M., Holzmann, J., Hartmann, R. K., Rossmannith, W., and Giegé, P.(2010). A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 740–744
41. Oerum, S., Roovers, M., Rambo, R. P., Kopec, J., Bailey, H. J., Fitzpatrick, F., Newman, J. A., Newman, W. G., Amberger, A., Zschocke, J., Droogmans, L., Oppermann, U., and Yue, W. W. (2018). Structural insight into the human mitochondrial tRNA purine N1-methyltransferase and ribonuclease P complexes. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 12862-12876
42. Schelcher, C., Sauter, C., & Giegé, P. (2016). Mechanistic and Structural Studies of Protein-Only RNase P Compared to Ribonucleoproteins Reveal the Two Faces of the Same Enzymatic Activity. *Biomolecules*, **6**(3), 30

43. Hsieh, J., Fierke, C. A. (2009). Conformational change in the *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme–pre-tRNA complex enhances substrate affinity and limits cleavage rate. *RNA*.; **15**:1565–1577.
44. Hsieh, J., Rueda, D., Koutmou, K. S., Koutmos, M., Walter, N. G., Fierke, C. A. (2010). A divalent cation stabilizes the active conformation of the *B. subtilis* RNase P pre-tRNA complex: A role for an inner-sphere metal ion in RNase P. *J. Mol. Biol.*; **400**:28–51
45. Beebe, J. A., Fierke, C. A. (1994). A kinetic mechanism for cleavage of precursor tRNA^{Asp} catalyzed by the RNA component of *Bacillus subtilis* Ribonuclease P. *Biochemistry*.; **33**:10294–10304.
46. Niranjanakumari, S., Day-Storms, J. J., Ahmed, M., Hsieh, J., Zahler, N. H., Venters, R. A., Fierke, C. A. (2007). Probing the architecture of the *B. subtilis* RNase P holoenzyme active site by crosslinking and affinity cleavage. *RNA*.; **13**:512–535
47. Buck A.H., Kazantsev A.V., Dalby A.B., Pace N.R. (2005). Structural perspective on the activation of RNase P RNA by protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*; **12**:958–964.
48. Howard, M. H., Klemm, B. P., Fierke, C. A. (2015). Mechanistic studies reveal similar catalytic strategies for phosphodiester bond hydrolysis by protein-only and RNA-dependent Ribonuclease P. *J. Biol. Chem.* ; **290**:13454–13464.
49. Pavlova, L.V., Gößringer, M., Weber, C., Buzet, A., Rossmann, W., Hartmann, R. K. (2012). tRNA processing by protein-only versus RNA-based RNase P: kinetic analysis reveals mechanistic differences. *ChemBioChem*.; **13**:2270–2276.
50. Howard, M. J., Karasik, A., Klemm, B. P., Mei, C., Shanmuganathan, A., Fierke, C. A., Koutmos M. (2016). Differential substrate recognition by isozymes of plant protein-only Ribonuclease P. *RNA*. 2016; **22**:782–792.
51. Hsieh, J., Walker, S. C., Fierke, C. A., & Engelke, D. R. (2009). Pre-tRNA turnover catalyzed by the yeast nuclear RNase P holoenzyme is limited by product release. *RNA (New York, N.Y.)*, **15**(2), 224–234.
52. Dirheimer, G., Keith, G., Dumas, P., Westhof, E. (1995). Primary, Secondary, and Tertiary Structures of tRNAs. In: Söll D., RajBhandary U.L., editors. tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function. 1st ed. *The American Society for Microbiology Press; Washington, DC, USA*: pp. 93–126. Chapter 8.
53. Frazer-Abel, A. A., & Hagerman, P. J. (2008). Core flexibility of a truncated metazoan mitochondrial tRNA. *Nucleic acids research*, **36**(17), 5472–5481.
54. Zahler, N. H., Christian, E. L., Harris, M. E. (2003). Recognition of the 5' leader of pre-tRNA substrates by the active site of Ribonuclease P. *RNA*.; **9**:734–745.
55. Koutmou, K. S., Zahler, N. H., Kurz, J. C., Campbell, F. E., Harris, M. E., Fierke, C. A. (2010). Protein–precursor tRNA contact leads to sequence-specific recognition of 5' leaders by bacterial Ribonuclease P. *J. Mol. Biol.*; **396**:195–208.

56. Zahler, N. H., Sun, L., Christian, E. L., Harris, M. E. (2005). The pre-tRNA nucleotide base and 2'-hydroxyl at N(-1) contribute to fidelity in tRNA processing by RNase P. *J. Mol. Biol.*; **345**:969–985.
57. Sinapah, S., Wu, S., Chen, Y., Pettersson, B. M., Gopalan, V., Kirsebom, L. A (2011). Cleavage of model substrates by archaeal RNase P: role of protein cofactors in cleavage-site selection. *Nucleic Acids Res.*; **39**:1105–1116.
58. Yuan, Y., Altman, S. (1995). Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *EMBO J.*; **14**:159–168.
59. Imai, T., Nakamura, T., Maeda, T., Nakayama, K., Gao, X., Nakashima, T., Kakuta, Y., Kimura, M. (2014). Pentatricopeptide repeat motifs in the processing enzyme PRORP1 in *Arabidopsis thaliana* play a crucial role in recognition of nucleotide bases at T ψ C loop in precursor tRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **450**:1541–1546.
60. Brillante, N., Gößringer, M., Lindenhofer, D., Toth, U., Rossmann, W., Hartmann, R. K. (2016). Substrate recognition and cleavage-site selection by a single-subunit protein-only RNase P. *Nucleic Acids Res.*; **44**:2323–2336.
61. Serruya, R, Orlovetskie, N, Reiner, R, Dehtiar-Zilber, Y, Wesolowski, D, Altman, S, Jarrous N. (2015). Human RNase P ribonucleoprotein is required for formation of initiation complexes of RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* **43**: 5442–5450.
62. Newhart, A., Powers, S. L., Shastrula, P. K, Sierra, I., Joo, L. M, Hayden, J. E, Cohen, A. R, Janicki, S. M. (2016). RNase P protein subunit Rpp29 represses histone H3.3 nucleosome deposition. *Mol Biol Cell* **27**: 1154–1169.
63. Molla-Herman, A., Vallés, A. M., Ganem-Elbaz, C., Antoniewski, C., Huynh, J. R. (2015). tRNA processing defects induce replication stress and Chk2-dependent disruption of piRNA transcription. *EMBO J* **34**: 3009–3027
64. Abu-Zhayia, E. R, Khoury-Haddad, H., Guttmann-Raviv, N., Serruya, R., Jarrous, N., Ayoub, N. (2017). A role of human RNase P subunits, Rpp29 and Rpp21, in homology directed-repair of double-strand breaks. *Sci Rep* **7**: 1002.
65. Lemieux, B., Laterreur, N., Perederina, A., Noël, J. F., Dubois, M. L, Krasilnikov, A. S., Wellinger, R. J. (2016). Active yeast telomerase shares subunits with ribonucleoproteins RNase P and RNase MRP. *Cell* **165**: 1171–1181
66. Cho, I. M., Lai, L. B., Susanti, D., Mukhopadhyay, B., Gopalan, V. (2010). Ribosomal protein L7Ae is a subunit of archaeal RNase P. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 14573–14578.
67. Esakova, O, Krasilnikov, A. S. (2010). Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family. *RNA* **16**: 1725–1747.
68. Jarrous, N. (2017). Roles of RNase P and its subunits. *Trends Genet.* **33**, 594–603.
69. Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., ... Ettema, T. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, **521**(7551), 173–179.

8. Sažetak

RNaza P je esencijalna endonukleaza koja katalizira procesiranje 5'-vodećeg slijeda pre-tRNA. Postoje dva tipa RNaze P: RNA-ovisni enzim tj ribonukleoprotein te isključivo proteinska RNaza P (PRORP). Oba oblika koriste sličan mehanizam katalize i prepoznavanja supstrata te je nedavno otkriveno da isključivo proteinski oblik postoji u svim domenama života, a ne samo kod eukariota, što je dovelo do pitanja zašto su oba oblika RNaze P opstala i koji je oblik onda zapravo ancestralni. Istraživanja komponenti ribonukleoproteinskog oblika RNaze P otkrila su da osim što ovaj enzim ima ulogu katalize procesiranja pre-tRNA, njegove podjedinice sudjeluju u mnogim drugim biokemijskim procesima koji su bitni za normalno funkcioniranje stanice zbog čega je njegov opstanak u stanici esencijalan. RNP oblici RNaze P u svim domenama života imaju visoko očuvano aktivno mjesto katalize, za razliku od PRORP oblika koji ne dijele nikakvu sličnost. Ove činjenice ukazuju na to da je RNP oblik ancestralni, a da su PRORP oblici kasnije neovisno konvergentno evoluirali. Evolucijska priča RNaze P veoma je kompleksna i postoje mnoga nagađanja kako se odvijala, no pravi odgovor još uvijek ostaje enigma.

9. Summary

RNase P is an essential endonuclease responsible for catalyzing 5' end maturation of pre-tRNAs. Two types of RNase P enzymes exist: RNA-dependent enzymes (ribonucleoproteins) and protein-only RNase Ps (PRORP). A recent discovery that both types of RNase P exist in all domains of life and that both types use a similar mechanism for catalysis and substrate recognition, inspires questions relating to the ancestral form of RNase P as well as to the reasoning for retention of both types in contemporary organisms. The protein components of RNA-dependent enzymes are not only involved in the catalyzes of 5' end maturation but they also play an important role in various biochemical processes in the cell. This may provide a plausible explanation why the retention of these proteins is essential. The active site of the RNA-dependent type of RNase P is universally conserved in all domains of life, unlike the active site of the protein only types of RNase P which greatly varies. This suggests that the RNA-dependent type of RNase P is the ancestral form and that the diverse PRORP forms convergently evolved afterwards. The evolutionary story of RNase P is very complex and there are many speculations on how RNase P evolved but the real answer is still not clear.