

Uloga transpozona u nastanku introna

Pali, Dorotea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:217:148264>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA TRANSPOZONA U NASTANKU INTRONA
(MECHANISM FOR DNA TRANSPOSONS TO GENERATE
INTRONS)

SEMINARSKI RAD

Dorotea Pali

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2017.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Introni i transpozonski elementi	2
2.1 Introni	2
2.2 Pokretni genetički elementi (transpozoni).....	3
3. Podrijetlo i nastanak introna.....	5
3.1 Podrijetlo introna.....	5
3.2 Mehanizmi nastanka i gubitka introna	5
4. Intronski elementi u zelenoj algi <i>Micromonas pusilli</i>	8
5. Uloga DNA transpozona IE u nastanku introna	10
5.1 Položaj IE-a u genomu <i>M. pusille</i>	10
5.2 IE-i u algi <i>Aureococcus anophagefferens</i>	11
5.3 Mehanizam umnažanja IE-a	11
5.4 Dinamika prijenosa IE-a.....	14
5.5 Uspješnost neautonomnih DNA transpozona kao introna.....	14
6. Literatura	16
7. Sažetak	19
8. Summary	20

1. Uvod

Centralna dogma molekularne biologije (F. Crick, 1958.) objašnjava prijenos genetičke informacije u živim organizmima. Informacija je zapisana u molekuli DNA, koja se replicira, potom prepisuje u molekulu RNA te prevodi u aminokiselinski slijed. Eukariotske mRNA prolaze kroz dodatan proces, tzv procesiranje, prilikom kojeg se na 5' kraj mRNA dodaje 7-metilgvanozinska kapa, na 3' kraj dodaje poliadeninski rep, izrezuju se introni, te spajaju eksoni.

Samo podrijetlo te mehanizmi ugradnje i umnažanja introna još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. S vremenom je otkriveno da su brojni introni novijeg podrijetla, odnosno pretpostavlja se da se proces ugradnje introna odvijao dugo kroz evoluciju (Cavalier-Smith, 1991), te se odvija i danas. Predloženo je nekoliko mehanizama, međutim niti jedan od njih još nije eksperimentalno dokazan u uvjetima *in vivo*.

Sama ideja da bi se introni kroz genom mogli kretati kao pokretni genetički elementi (transpozoni) predložena je od strane Cavalier-Smitha 1985.g., kada je dokazano stvaranje transpozonskih elemenata iz mRNA pomoću nesavršenog izrezivanja introna. Istraživanja koja su uslijedila pokazala su kako se proces izrezivanja i ugradnje introna uz pomoć transpozona u nekim organizmima događa i u današnjem modernom vremenu, što se potkrijepljuje usporedbenim analizama današnjih uzoraka i onim sakupljenim prije nekoliko desetaka godina.

Ovaj seminarski rad bazira se na novootkrivenim intronima pelagofitne alge *Micromonas pusille*, koji eksperimentalno pokazuju sve odlike transpozonskih elemenata. Takvi introni ugrađeni su nedavno, a njihov mehanizam ugradnje pobliže je objašnjen u poglavljima koja slijede.

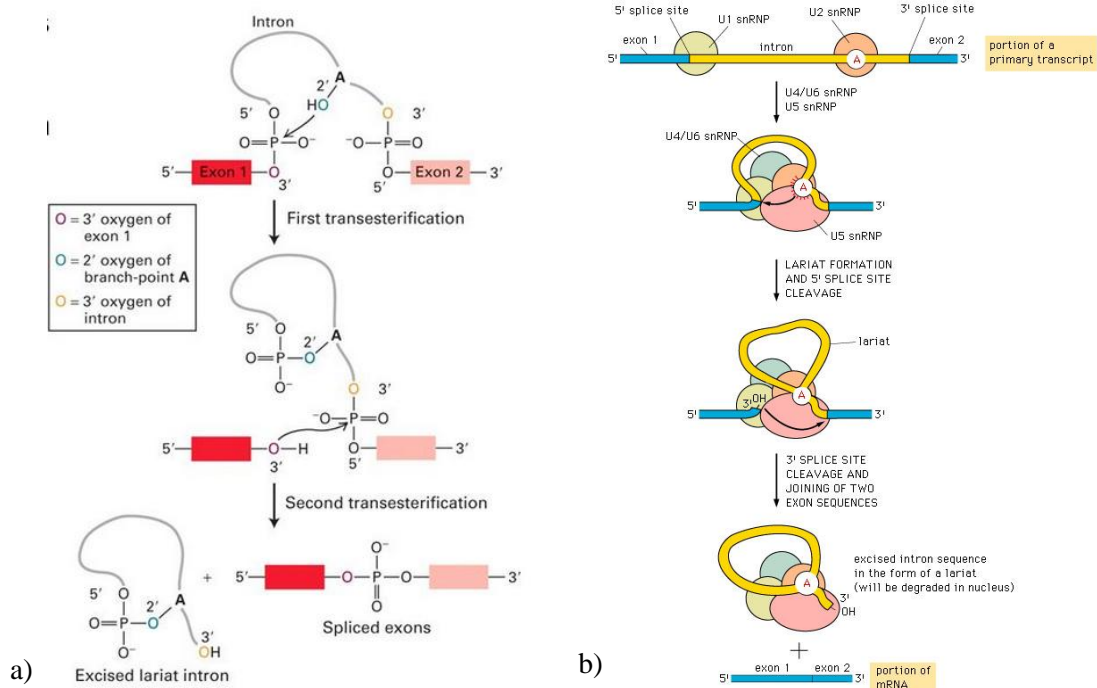
2. Introni i transpozonski elementi

2.1 Introni

Introni su nekodirajuće regije koje zauzimaju oko 95 % ljudskog genoma (Fedorova i Fedorov, 2003). Prvotno su otkriveni u adenovirusima (Berget i sur., 1977), a imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije, kodiranju nekodirajućih molekula RNA, prijenosu mRNA preko jezgrine ovojnice te alternativnom prekrajanju i eksonskom preslagivanju.

Postoje četiri skupine introna u prirodi: spliceosomi, tRNA introni, te samoizrezujući introni grupe I i II. Spliceosomi su bitni za proces izrezivanja introna iz mRNA eukariota. Proces je kataliziran od strane ribonukleoproteinskog kompleksa sastavljenog od pet malih molekula RNA (U1, U2, U4, U5 i U6 small nuclear RNA (snRNA)) i oko 200-tinjak proteina, prikazanih na Slici 1.b. Struktura većine spliceosomalnih introna sastoji se od 5' mjesta izrezivanja, dinukleotida AG na 3' mjestu izrezivanja, katalitičkog adenzina (točka grananja) te polipirimidinske sekvence između adenzina i 3' mjesta rezanja. Ti elementi prepoznati su od strane glavnih komponenti ribonukleoproteinskog kompleksa. Proces izrezivanja sastoji se od dvije uzastopne transesterifikacijske reakcije, katalizirane od strane snRNA, prikazane na Slici 1.a. 2' OH skupina specifičnog adenzina u intronu nukleofilno napada 5' kraj introna, formirajući strukturu petlje. 3' OH kraj uzvodnog eksona potom reagira kao nukleofil, napadajući tako 5' kraj nizvodnog eksona, čime dolazi do ligacije (Irimia i Roy, 2014).

Istraživanja su pokazala kako su spliceosomi vjerojatno evoluirali od samoizrezujućih introna grupe II, čija je autokatalitička domena zamijenjena s ribonukleoproteinskim kompleksom spliceosoma. Zasad se najtočnija pokazala hipoteza koja kaže da su spliceosomi podrijetlom zapravo introni grupe II α -proteobakterije koja je endosimbiozom ušla u buduću eukariotsku stanicu, te prenijela genetički materijal iz proteomitohondrija u genom domaćina (Irimia i Roy, 2014). Obje skupine introna izrezuju se kroz dvije karakteristične katalitičke reakcije koje se zasnivaju na endogenom adenzinu i otpuštaju intron u obliku petlje. Osim strukturne sličnosti glavnih domena, introni grupe II i snRNA spliceosoma sadržavaju i slične vezne sekvence (GT-AY za introne grupe II te GT-AG za spliceosome) (Irimia i Roy, 2014).



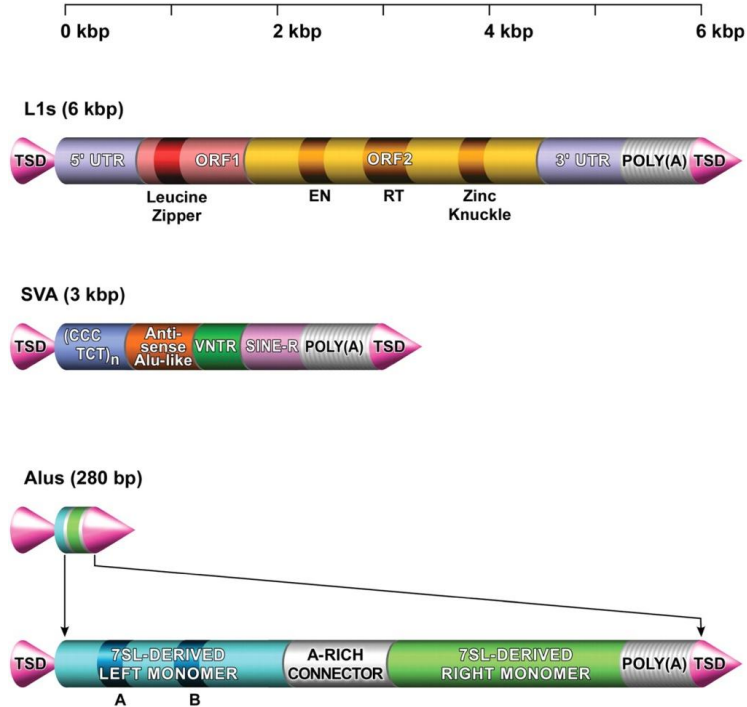
Slika 1. a) Transesterifikacijske reakcije izrezivanja introna iz mRNA eukariota. Preuzeto s: http://images.slideplayer.com/23/6905003/slides/slide_7.jpg. b) Izrezivanje introna pomoću ribonukleoproteinskog kompleksa prilikom procesiranja mRNA u eukariota. Preuzeto s: http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/ECB/CH07/7_16.jpg.

2.2 Pokretni genetički elementi (transpozoni)

Transpozonski elementi (TE) su pokretni genetički elementi otkriveni od strane Barbare McClintock 1945.g. na kukuruzu. Pokretanjem po genomu, TE utječu na ekspresiju gena i gensku strukturu, a sudjeluju i u formiranju pseudogena. Transpozoni zauzimaju oko 40 % ljudskog genoma, iako je tek manje od 0,05 % njih zadržalo mogućnost transpozicije (Muotri i sur., 2007).

Postoje dvije vrste pokretnih genetičkih elemenata, DNA i RNA transpozoni (koji su karakteristični samo za eukariote). DNA transpozoni pokreću se uz pomoć enzima transpozaze, te se kod prokariota dijele u tri skupine: jednostavne IS elemente, kompleksne i složene transpozone. Složeni transpozoni sadrže i gen za enzym rezolvazu, koji omogućuje razrješenje strukture ko-integrata prilikom replikativne transpozicije. Najviše proučavani transpozonski elementi dio su *eng.* Long Interspaced Nuclear Element (LINE) i *eng.* Short Interspaced Nuclear Element (SINE) skupina retrotranspozona (tzv RNA transpozona) koji se pokreću mehanizmom „copy and paste“. LINE i SINE jedini su pokretni TE u većine sisavaca (Muotri i sur., 2007), a najčešće je riječ o L1, SVA te Alu elementima, koji su prikazani na Slici 2. Za razliku od elemenata s dugim terminalnim ponavljanjima (*eng.* Long Terminal

Repeat, LTR) koji su retroviralnog podrijetla, LINE i SINE ne sadrže LTR-ove i ne pokreću se uz pomoć integraze.



Slika 2. L1, SVA i Alu elementi, aktivni transpozonski elementi u ljudskom genomu. Preuzeto od: Muotri i sur., 2007.

LINE zauzimaju oko 20 % genoma sisavaca (Muotri i sur., 2007), a nastali su od transkripata RNA polimeraze II. Sukladno filogenjskoj analizi enzima reverzne transkriptaze, elementi L1 pokazuju najveću srodnost s intronima grupe II mitohondrija i eubakterija (Xiong i Eickbush, 1990), što je i u skladu s prije spomenutom teorijom o prijenosu introna grupe II iz α -proteobakterije u genom budućeg eukariota i nastankom spliceosoma. Autonomnost LINE-a osigurana je daljnjim stjecanjem gena za enzim endonukleazu te promotorske sekvence, što je osiguralo njihovu mobilnost u genomu.

Za razliku od LINE-a, SINE ne pokazuju autonomnost. Nastali su od transkripata RNA polimeraze III, a za pokretanje koriste postojeće mehanizme LINE-a. Alu elementi najbrojnija su skupina SINE-a, te se povezuju s alternativnim izrezivanjem, uređivanjem RNA te regulacijom translacije (Hasler i Strub, 2006). Također je poznato da je oko 0,1 % svih genskih poremećaja u ljudi povezano s pokretanjem Alu elemenata. Istraživanja su pokazala kako je razina njihove ekspresije vezana uz pojavu stresnih uvjeta u organizmu (Rubin i sur., 2002).

3. Podrijetlo i nastanak introna

3.1 Podrijetlo introna

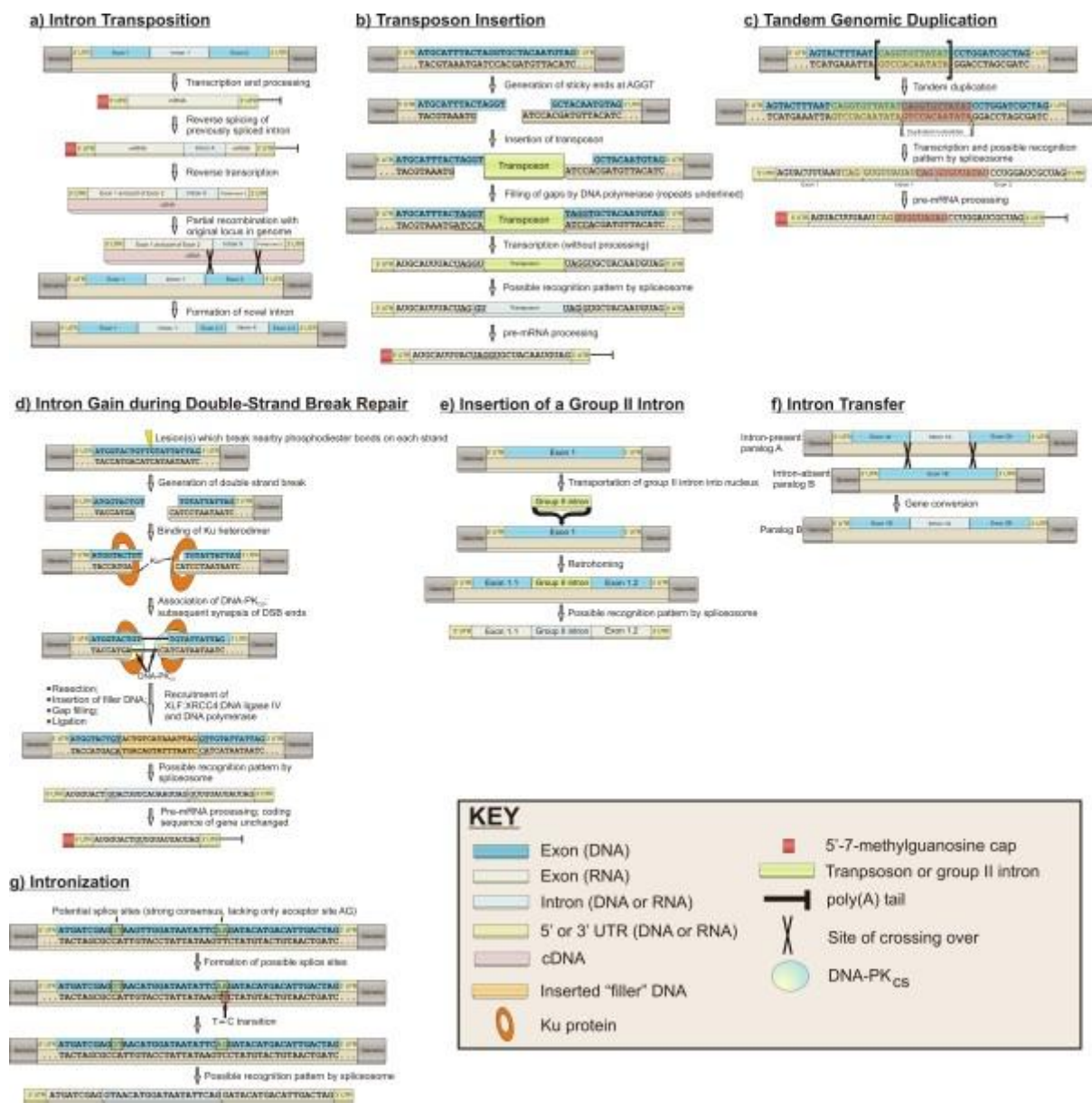
Hipoteza o ranom nastanku introna tvrdi kako su introni postojali već u genomu zajedničkog pretka LUCA-e (Last Common Universal Ancestor), te su tijekom evolucije izgubljeni kod prokariota. Hipoteza o kasnom nastanku introna pretpostavlja da je genom LUCA-e sadržavao samo eksone, a nekodirajuće sekvence su kasnije ugrađene u genom (Cavalier-Smith, 1985).

U skladu s hipotezom o kasnom nastanku introna, pretpostavljeno je da se introni ugrađuju mehanizmom pokretnih elemenata (Cavalier-Smith, 1985). Istraživanja na kukuruзу i vinskoј mušici *Drosophila melanogaster* pokazala su da, iako njihovi introni ne posjeduju precizna terminalna mjesta izrezivanja, nesavršenim izrezivanjem iz pre-mRNA nastaju transpozonski elementi (Purugganan i Wessler, 1992.) To uključuje nedavno ugrađene elemente Ac/Ds kod kukuruза te P elemente kod *Drosophila melanogaster*. Iako je riječ o nesavršenom izrezivanju, koje stvara transkripte modificirane na 5' kraju ili promijenjene proteinske strukture, dokazi idu u korist teoriji kasnog izrezivanja introna (Purugganan i Wessler, 1992).

3.2 Mehanizmi nastanka i gubitka introna

Identificirana su dva mehanizma gubitka introna: model gubitka introna pomoću reverzne transkriptaze (*eng.* Reverse Transcriptase-Mediated Intron Loss, RTMIL) i delecije dijelova genoma. Model RTMIL predlaže da se procesirana mRNA molekula reverzno prepisuje pomoću reverzne transkriptaze (RT), te se nastala molekula cDNA ugrađuje u genom homolognom rekombinacijom (Fink, 1987), što može rezultirati gubitkom nekodirajućih sekvenci. Same delecije najčešće nastaju kao posljedica direktnih ponavljanja na krajevima introna (Cohen i sur., 2011).

Procesi stvaranja novih introna slabije su istraženi. Zasad je predloženo sedam modela, čiji su mehanizmi prikazani na Slici 3. Osim dolje navedenih modela, koji zasad najbolje objašnjavaju mogući nastanak novih introna, predloženi su i oni poput zamjene vodećeg lanca te proklizavanja reverzne transkriptaze (Cohen i sur., 2011), koji su ipak manje vjerojatni.



Slika 3. Sedam predloženih mehanizama ugradnje i izrezivanja introna u eukariota. Preuzeto od: Yenerall i Zhou, 2012.

a) Prema modelu transpozicije, introni se reverznim izrezivanjem mogu ugraditi u vlastitu ili blisku molekulu mRNA, te potom reverzno prepisati i ugraditi u genom pomoću homologne rekombinacije (Sharp, 1985). Očito je da reverzna transkriptaza ima odgovarajuću ulogu i u ugradnji introna.

b) Model ugradnje transpozona pretpostavlja da transpozonski elementi mogu postati introni, najčešće zbog gubitka mobilnosti ili steknutih signala za izrezivanje (Crick, 1979). Pravilno ili djelomično pravilno izrezivanje takvih introna vrši se uz pomoć spliceosoma (Yenerall i Zhou, 2012).

c) Model uzastopnog ponavljanja pretpostavlja kako se duplikacijom eksonske regije, koja sadržava sekvencu AGGT, stvaraju 5' i 3' mjesta izrezivanja, koja omogućuju da se uz pomoć spliceosoma precizno izreže sekvenca između tih dvaju mjesta AGGT, odnosno precizno izreže intron.

d) Prema modelu nehomolognog spajanja krajeva (*eng.* Non-homologous end joining, NHEJ), tijekom NHEJ popravka dvolančanog loma, kratke sekvence DNA ugrađuju se u genomsku DNA u obliku introna.

e) Model samoizrezujućih introna objašnjava kako su introni grupe II, nakon prijenosa iz α -proteobakterije, vjerojatno prošli kroz procese degradacije i nakupljanja točkastih mutacija te svojevrsno poprimili svojstva spliceosoma.

f) Model prijenosa introna pretpostavlja prijenos introna s paraloga ili pseudogena rekombinacijom na područje bez introna u njegovom sestrinskom paralogu. Shodno tome, paralogni geni trebali bi češće ugrađivati nove introne, u odnosu na ne-paralogne gene.

g) Prema modelu intronizacije, točkaste mutacije u kodirajućim sekvencama stvaraju nova mjesta izrezivanja, pretvarajući tako dio eksona u intron (Yenerall i Zhou, 2012).

4. Intronski elementi u zelenoj algi *Micromonas pusilli*

Oko 10 000 skoro identičnih introna pronađeno je u izolatu CCMP1545 jednostanične zelene alge *Micromonas pusille*, ekološki važne morske prasinofitne alge. Nazvani su intronski elementi (*eng.* Introner Element, IE), zauzimaju oko 9 % genoma alge, a prisutni su u trećini gena CCMP1545. U pravilu su dulji od ostalih introna te pokazuju postojanje stabilnije strukture nakon izrezivanja. S obzirom da IE-i najčešće nisu konzervirani na razini sekvenci, to ukazuje da su vjerojatno novijeg podrijetla. Postoji relativno velika mogućnost povezanosti njihove proliferacije s transkripcijom, budući da su skoro uvijek pronađeni u kodirajućem lancu DNA u dijelovima genoma koji se prepisuju (Koolhaas, 2013). Istraživanja su pokazala da se nastanak ovih introna direktno povezuje s ugradnjom neautonomnih DNA transpozona, odnosno da su nastali ugradnjom istih.

Tri su glavne karakteristike ovih elemenata. Prvo, svaka skupina IE-a ima slične sekvence, primjerice skupina IE3 ima čak 32 člana s identičnim nukleotidnim sekvencama (Worden i sur., 2009). Drugo, svaki IE uklanja se iz mRNA nakon transkripcije. Treće, s vremenom dolazi do širenja IE-a u genomu, po uzoru na ostale introne.

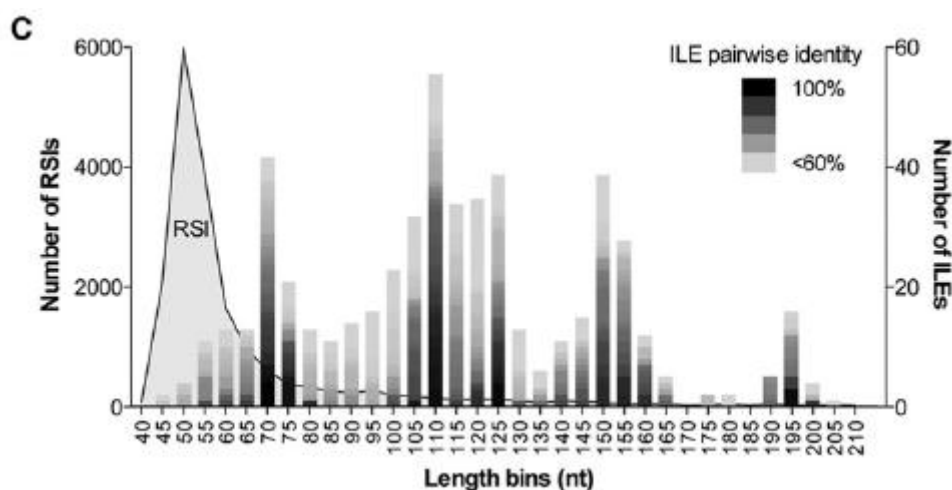
Genom *M. pusille* CCMP1545 je čak 1 Mpb veći od onog *Micromonas sp.* RCC299, upravo zahvaljujući prisutnosti četiriju skupina IE-a (IE1-IE4) (Worden i sur., 2009). RCC299 ne sadrži IE-e iz skupine CCMP1545, već svoje vlastite IE-e (Verhelst i sur., 2013). Vrste IE-a kod sojeva CCMP1545 i RCC299, zajedno s ostalim intronima, prikazane su u Tablici 1. Obje skupine dijele oko 90 % protein kodirajućih gena (Worden i sur., 2009).

IE-i nisu jednoliko rasprostranjeni u genomu *M. pusille* CCMP1545, u pravilu su odustni u GC siromašnim regijama. Sklonost ugradnji u bogate GC regije izraženija je u odnosu na ostale introne (Verhelst i sur., 2013). IE-i ne pokazuju usmjerenost ka pojedinoj vrsti sekvenci ili gena, iako je zabilježena manja pojavnost u genima koji kodiraju za ribosomalne strukturne komponente (doduše ti geni su općenito lišeni introna) (Verhelst i sur., 2013). Većinom se ugrađuju u središnji dio gena. Usporedbe radi, obični introni se u pravilu ugrađuju u rubne dijelove gena. Verhelst i sur. pretpostavili su kako se IE-i vjerojatno prenose pomoću transpozicije introna te da se ugrađuju homolognom rekombinacijom.

Tablica 1. Analiza vrsti i karakteristika introna algi *Micromonas*. Preuzeto od: Verhelst i sur., 2013.

Organism	Intron Type	Intron Class (Family)	Intron Count	Average Length	% EST Validated	Hosting Genes
RCC299	Singleton	Canonical	4,063	162	31.8	3,063
	Singleton	BOC1	625	65	82.7	157
	Repeat	IE-C	221	67	23.1	150
CCMP1545	Singleton	Canonical	3,553	192	42.6	2,742
	Singleton	BOC1	770	74	90.6	138
	Repeat	IE-A	6,112	173	23.4	3,162
	Repeat	IE-A1	4,328	189	25.0	2,677
	Repeat	IE-A2	1,004	110	16.7	610
	Repeat	IE-A3	328	148	24.4	297
	Repeat	IE-A4	100	185	26.0	93
	Repeat	IE-A7	352	183	21.0	311
	Repeat	IE-B	25	1,830	20.0	25
	Repeat	IE-D	6	374	0.0	6

Element sličan intronskom elementu kod *M. pusille* nedavno je pronađen u genomima nekoliko vrsta gljiva. Nazvan je *eng.* Introner Like Element (ILE). Takvi elementi dulji su od običnih introna (prikazano na Slici 4) te pokazuju stabilnu konzerviranu sekundarnu strukturu, zahvaljujući trima sekundarnim ukosnicama i Gibbsovoj slobodnoj energiji (ΔG), koja je niža od očekivane.



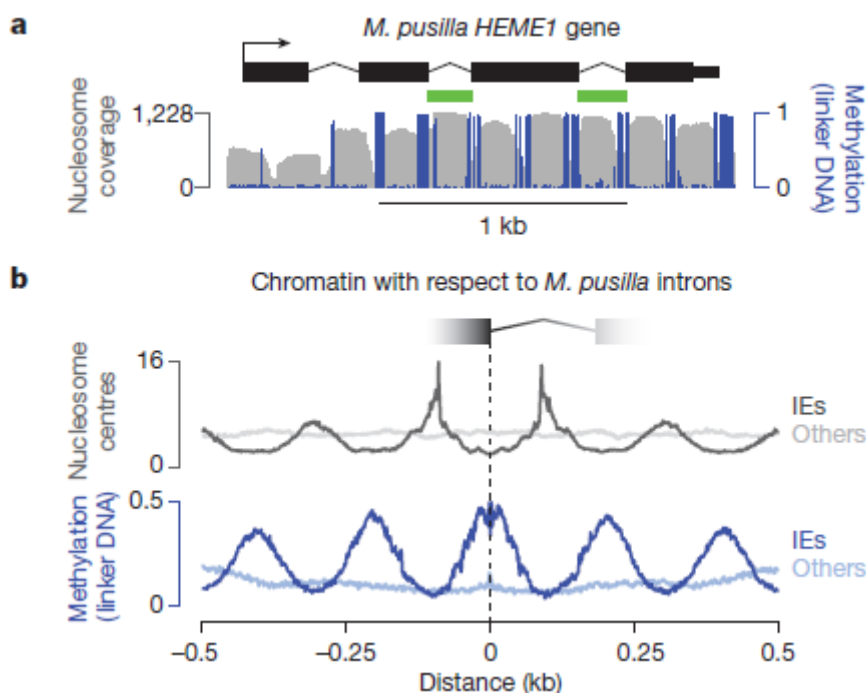
Slika 4. Distribucija duljine elemenata sličnih intronskim elementima (*eng.* Introner Like Element, ILE) i introna gljive *C. fulvum*. ILE-i su u pravilu uvijek dulji od običnih introna. Preuzeto od: van der Burgt i sur., 2012.

Analiza je pokazala da se ILE-i izrezuju po uzoru na spliceosome. Budući da su podložni degeneraciji, s vremenom gube svoju sekundarnu strukturu i mogućnost umnažanja, te postaju ekvivalentni običnim intronima. Najčešće se ugrađuju u središnji dio gena, baš kao i IE-i kod *M. pusille*. Za razliku od ILE-a, IE-i nemaju predvidljivu stabilnu sekundarnu strukturu.

5. Uloga DNA transpozona IE u nastanku introna

5.1 Položaj IE-a u genomu *M. pusille*

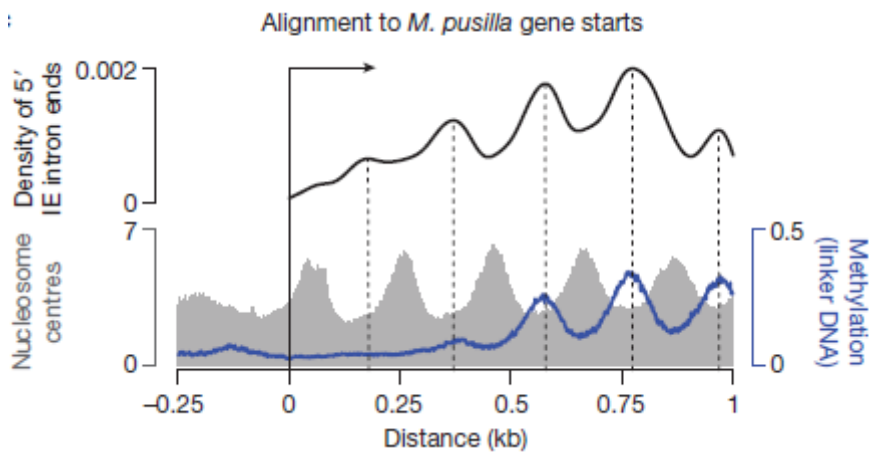
Koristeći se nukleotid-rezolucijskim genomskim kromatinskim mapama, analizom 3,347 RNA IE-a *Micromonas pusille*, otkriveno je kako je većina njih poravnata s nukleosomima, tj čini jedan nukleosom, kako je prikazano na Slici 5.a. Čak 73 % krajeva IE-a nalazi se u vezujućoj DNA, koja u slučaju *M. pusille* pokazuje veliki stupanj metilacije citozina (Huff i sur., 2016). Usporedbe radi, ostali introni niti pokazuju takvo poravnanje s nukleosomima, niti se preferirano ugrađuju u metiliranu DNA, što je vidljivo na Slici 5.b (Huff i sur., 2016).



Slika 5. Prikaz ugradnje intronskih elemenata (*eng.* Introner Element, IE) alge *Micromonas pusille* između postojećih nukleosoma. a) Ugrađeni IE-i poravnati s postojećim nukleosomima, razdvojeni metiliranom DNA. b) Usporedba IE-a i ostalih introna, s obzirom na ugradnju u vezujuću DNA koja je metilirana na citozinu. Preuzeto od: Huff i sur., 2016.

Huff i sur. pokazuju da su novougrađeni IE-i fazno poravnati s početkom gena (Slika 6), što pojašnjava njihovu ugradnju u metiliranu DNA između postojećih nukleosoma. Analiza IE-a ugrađenih na 5' krajevima gena, koji nisu metilirani na citozinu, pokazala je da se IE-i ugrađuju u vezujuću DNA neovisno o njoj metiliranosti. U skladu s time, IE-i ugrađeni u nemetilirane dijelove i dalje pokazuju poravnanje s nukleosomima (Huff i sur., 2016).

Budući da se DNA transpozoni najčešće ugrađuju između nukleosoma (Gangadharan i sur., 2010), ne čudi što su IE-i pronađeni upravo na tim mjestima. Njihova ugradnja u vezujuću DNA određena je samom strukturom kromatina. U slučaju iznimno brze ugradnje velikog broj IE-a na maloj udaljenosti, mogu se stvoriti segmenti veličine nukleosoma (Huff i sur., 2016). Ta činjenica objasnila bi poklapanje eksona s položajem nukleosoma, odnosno približno istu duljinu eksona i nukleosoma u životinjskom svijetu (Schwartz i sur., 2009).



Slika 6. Prikaz intronskih elemenata (*eng.* Introner Element, IE) alge *Micromonas pusille* poravnatih s početkom gena, odnosno prikaz 5' krajeva IE-a u odnosu na početne dijelove gena. IE-i fazno su poravnati s početkom gena. Preuzeto od: Huff i sur., 2016.

5.2 IE-i u algi *Aureococcus anophagefferens*

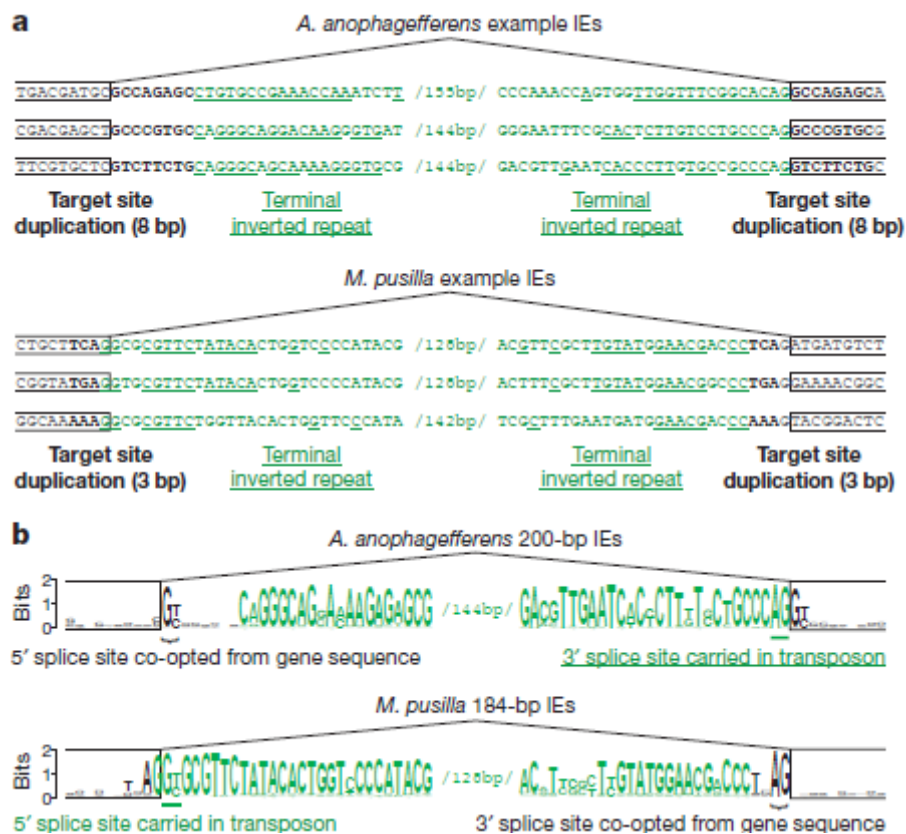
Istraživanja na drugoj vrsti alge, pelagofitnoj algi *A. anophagefferens*, također su pokazala postojanje IE-a. Identificirana su 602 IE-a, koji zauzimaju oko 11 % svih introna tog organizma. Specifične su duljine, a svrstani su u dvije kategorije. Podaci pokazuju da se i ovi elementi ugrađuju između postojećih nukleosoma, iako ne pokazuju nikakvu sličnost s elementima pronađenim kod *M. pusille* (Huff i sur., 2016).

5.3 Mehanizam umnažanja IE-a

Zbog očigledne sličnosti u duljini i sekvencama IE-a, vjerojatno je došlo do njihova umnažanja u genomu od jednog početnog introna. Dosad predloženi mehanizmi pretpostavili su izrezivanje i umnaženje putem mehanizma reverznog izrezivanja, koji je karakterističan za introne grupe II (Lambowitz i Zimmerly, 2011). Međutim, Huff i sur. otkrili su kako IE-i kod *M. pusille* i *A. anophagefferens* prilikom svoje ugradnje stvaraju duplicirana ciljna mjesta (*eng.* Target Site Duplication, TSD), sekvence koje se direktno ponavljaju i ne bi trebale nastati tijekom reverznog izrezivanja. TSD-i kod *M. pusille* dugi su 3 pb, a kod *A. anophagefferens* 8 pb. Na rubnim dijelovima IE-a, s unutrašnje strane TSD-a, nalaze se

invertna ponavljanja. Obje vrste sekvenci kod navedenih organizama prikazane su na Slici 7.a. Elementi koji se ugrađuju u dvolančanu DNA uz pomoć cik-cak ureza, stvarajući direktna ponavljanja, nazivaju se DNA transpozoni. Budući da su IE-i mali i ne sadrže otvorene okvire čitanja, ne mogu sami kodirati za transpozazu, već je ona kodirana negdje drugdje u genomu. Shodno tome, svrstani su u neautonomne DNA transpozone, odnosno *eng.* Miniature Inverted-repeat Transposable Elements (MITE) (Huff i sur., 2016).

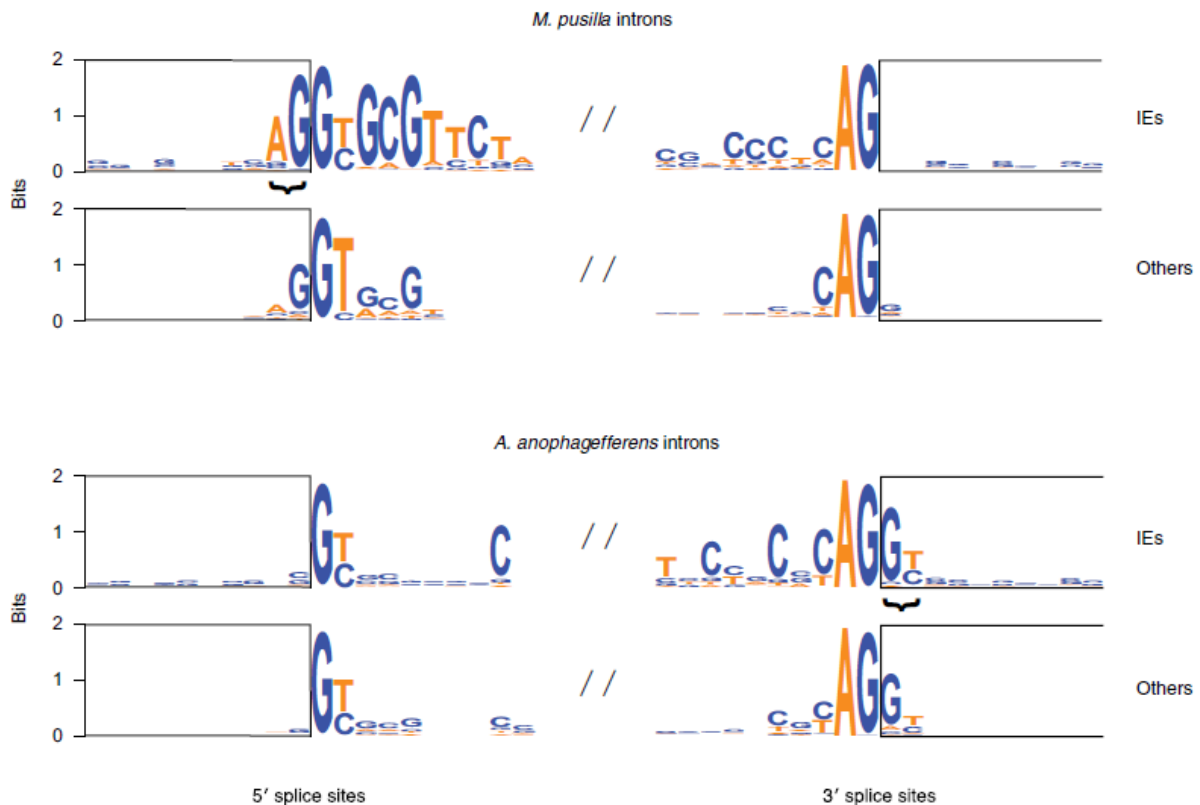
Svaki IE sadrži samo jedno mjesto izrezivanja na kraju jednog invertnog rubnog ponavljanja (*eng.* Terminal Inverted Repeat, TIR). IE-i *M. pusille* sadržavaju 5' mjesto izrezivanja (5'-GT-3' ili 5'-GC-3'), a *A. anophagefferens* 3' mjesto izrezivanja (5'-AG-3'). Mjesto drugog ureza nalazi se unutar TSD-a s druge strane tog elementa, koji je nastao prilikom ugradnje IE-a, što je prikazano na Slici 7.b i Slici 9 (Huff i sur., 2016).



Slika 7. a) Prikaz invertiranih rubnih ponavljanja (*eng.* Terminal Inverted Repeat, TIR) i dupliranih ciljnih mjesta (*eng.* Target Site Duplication, TSD) kod intronskih elemenata (*eng.* Introner Element, IE) algi *M. pusille* i *A. anophagefferens*. b) Mjesta izrezivanja IE-a kod algi *M. pusille* i *A. anophagefferens*. Svaki IE sadrži jedno mjesto izrezivanja unutar TIR-a, a drugo unutar TSD-a, koji je nastao prilikom ugradnje tog elementa. Preuzeto od: Huff i sur., 2016.

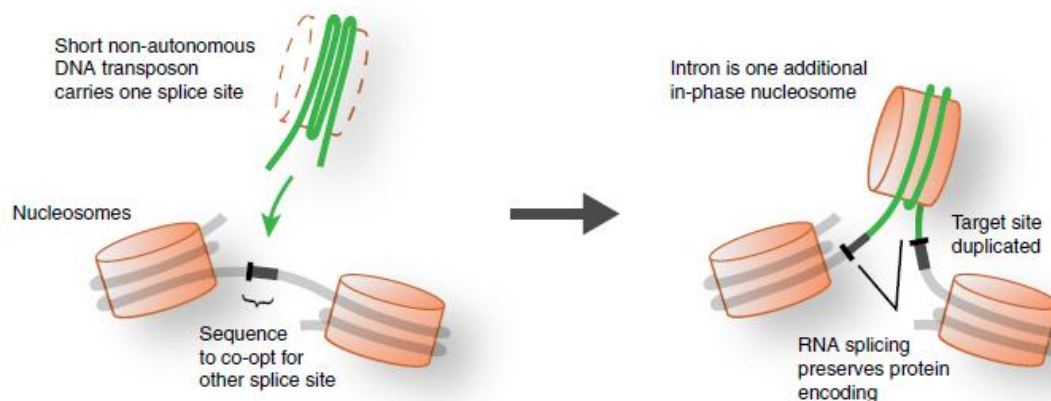
Sekvenca koja se izrezuje s jedne strane je eksonska (TSD), a s druge intronska (TIR), kako bi se prilikom izrezivanja introna omogućio nastanak originalnog proteina kodiranog

susjednim eksonom, odnosno kako bi se intron pravilno irezao. Sam IE mora odabrati najpovoljnije mjesto za ugradnju, koje će mu omogućiti sekvencu unutar TSD-a za izrezivanje, tj. sekvencu AG kao 3' mjesto izrezivanja kod *M. pusille* i sekvencu GY (Y=C ili T) kao 5' mjesto izrezivanja kod *A. anophagefferens* (Slika 8). Odabrane sekvence za ugradnju fazono su poravnate u odnosu na kodone. Takav način ugradnje direktno je povezan s raspodjelom introna u brojnim organizmima (Huff i sur., 2016).



Slika 8. Prikaz 5' mjesta izrezivanja (5'-GT-3' ili 5'-GC-3') i sekvence AG unutar dupliciranog ciljnog mjesta (eng. Target Site Duplication, TSD) kao 3' mjesta izrezivanja kod alge *M. pusille* te 3' mjesta izrezivanja (5'-AG-3') i sekvence GY (Y=C ili T) unutar dupliciranog ciljnog mjesta (eng. Target Site Duplication, TSD) kao 5' mjesta izrezivanja kod alge *A. anophagefferens*. Preuzeto od: Huff i sur., 2016.

Ovisno o prisutnosti TIR-a, neki se IE-i mogu izrezivati u obje orijentacije. Veliki broj IE-a *A. anophagefferens* sadrži 3' mjesto izrezivanja u obje orijentacije te može stvarati introne u obje orijentacije, što dodatno potvrđuje da se radi o transpozonomima. Neki od njih sadrže nejednolike TIR-e, odnosno imaju mjesto izrezivanja u samo jednoj orijentaciji (Huff i sur., 2016). IE-i *M. pusille* većinom sadrže 5' mjesto izrezivanja u dominantnoj orijentaciji (Worden i sur., 2009), a ako se nađu u suprotnoj orijentaciji, ne izrezuju se kao introni (van Baren, 2016).



Slika 9. Ugradnja novog intronskog elementa (*eng.* Introner Element, IE) urezom unutar invertnog rubnog ponavljanja (*eng.* Terminal Inverted Repeat, TIR) te urezom unutar dupliciranog ciljnog mjesta (*eng.* Target Site Duplication, TSD). Novougrađeni intron fazno je poravnat u odnosu na postojeće nukleosome. Preuzeto od: Huff i sur., 2016.

5.4 Dinamika prijenosa IE-a

Sekvencirajući uzorak *A. anophagefferens* 11 godini stariji od početnog uzorka, pronađeno je da 87 % pretraženih gena sadrži IE prisutan u oba alela, 42 gena sadrže IE unutar samo jednog alela, a 33 gena uopće ne sadrže IE-e (Huff i sur., 2016), što je dokaz njihove mobilnosti u novije vrijeme. Od 47 elemenata pronađenih isključivo u novijem izolatu, 31 varira u prisutnosti (Huff i sur., 2016), pokazujući da je očito došlo i do ugradnje novih IE-a. Geni koji više ne sadrže IE-e, imaju sekvence koje su u skladu s mjestom izrezivanja DNA transpozona s 8-pb TSD-ima (Huff i sur., 2016), što znači da je na tim mjestima došlo do izrezivanja IE-a.

5.5 Uspješnost neautonomnih DNA transpozona kao introna

Manjak sličnosti u sekvencama IE-a *M. pusille* i *A. anophagefferens* (Huff i sur., 2016), te njihova divergencija prije milijardu godina (Parfrey i sur., 2011), ukazuju na njihovu neovisnu evoluciju. Ideju potkrijepljuje činjenica da elementi sadrže različite TSD-e, dakle prenose se uz pomoć različitih transpozaza (Feschotte i Pritham, 2007), te posjeduju različita mjesta izrezivanja (Huff i sur., 2016). Takva neovisna evolucija vjerojatno je dokaz kako ovaj način prijenosa nije specifičan, već ga je moguće pronaći u većem broju organizama.

Više je razloga zašto su DNA transpozoni tako uspješni u stvaranju novih introna. DNA transpozoni ne trebaju se prepisivati kako bi se prenosili (suprotno predloženom mehanizmu reverznog izrezivanja 2011.g. od strane Lambowitz i Zimmerlyja), omogućujući širenje između nisko eksprimiranih gena (Huff i sur., 2016). Suprotno mehanizmu reverznog

izrezivanja, gdje su zbog njihove mobilnosti mjesta ugradnje ograničena i postoji mogućnost promjene genske ekspresije (Qu i sur., 2014), DNA transpozoni sa samo jednim mjestom izrezivanja stvaraju introne koji se savršeno izrezuju uz minimalan zahtjev postojanja kratke sekvence u TSD-ima susjednog eksona (Huff i sur., 2016). Neautonomni DNA transpozoni kratki su i ne kodiraju za transpozazu, što im također omogućuje efektno izrezivanje.

Do stvaranja novih intronskih sekvenci te njihova širenja unutar genoma došlo je zbog brzog evolucijskog razvitka i mutacijskih promjena u IE-ima te njihova jednostavnog mehanizma ugradnje. Iako je izuzetno jednostavan, mehanizam je zasad pronađen u malom broju organizama te se pretpostavlja da nije toliko raširen u eukariotskom svijetu. Međutim, takav način izrezivanja zasad je jedini okarakterizirani i pobliže opisani model njihova nastanka i prijenosa.

6. Literatura

Berget, S., Moore, C. and Sharp, P. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, pp.3171-3175.

Cavalier-Smith, T. (1991). Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends in Genetics*, 7, pp.145-148.

Cavalier-Smith, T. (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature*, 315, pp.283-284.

Cohen, N., Shen, R. and Carmel, L. (2011). The Role of Reverse Transcriptase in Intron Gain and Loss Mechanisms. *Molecular Biology and Evolution*, 29, pp.179-186.

Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science*, 204, pp.264-271.

Fedorova, L. and Fedorov, A. (2003). Introns in gene evolution. *Genetica*, 118, pp.123-131.

Feschotte, C. and Pritham, E. (2007). DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annual Review of Genetics*, 41, pp.331-368.

Fink, G. (1987). Pseudogenes in yeast?. *Cell*, 49, pp.5-6.

Gangadharan, S., Mularoni, L., Fain-Thornton, J., Wheelan, S. and Craig, N. (2010). DNA transposon Hermes inserts into DNA in nucleosome-free regions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, pp.21966-21972.

Hasler, J. and Strub, K. (2006). Alu RNP and Alu RNA regulate translation initiation in vitro. *Nucleic Acids Research*, 34, pp.2374-2385.

Huff, J., Zilberman, D. and Roy, S. (2016). Mechanism for DNA transposons to generate introns on genomic scales. *Nature*, 538, pp.533-536.

Irimia, M. and Roy, S. (2014). Origin of Spliceosomal Introns and Alternative Splicing. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, pp.016071-016071.

Koolhaas, I. (2013). *Multiplication of Introner-Like Elements in Fungi..* Minor, MSc. Wageningen University and Research Centre.

Lambowitz, A. and Zimmerly, S. (2011). Group II Introns: Mobile Ribozymes that Invade DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, pp.003616-003616.

- Muotri, A., Marchetto, M., Coufal, N. and Gage, F. (2007). The necessary junk: new functions for transposable elements. *Human Molecular Genetics*, 16, pp.159-167.
- Parfrey, L., Lahr, D., Knoll, A. and Katz, L. (2011). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, pp.13624-13629.
- Purugganan, M. and Wessler, S. (1992). The splicing of transposable elements and its role in intron evolution. *Genetica*, 86, pp.295-303.
- Qu, G., Dong, X., Piazza, C., Chalamcharla, V., Lutz, S., Curcio, M. and Belfort, M. (2014). RNA-RNA interactions and pre-mRNA mislocalization as drivers of group II intron loss from nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, pp.6612-6617.
- Rubin, C., Kimura, R. and Schmid, C. (2002). Selective stimulation of translational expression by Alu RNA. *Nucleic Acids Research*, 30, pp.3253-3261.
- Schwartz, S., Meshorer, E. and Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, pp.990-995.
- Sharp, P. (1985). On the origin of RNA splicing and introns. *Cell*, 42, pp.397-400.
- van Baren, M. (2016). Evidence-based green algal genomics reveals marine diversity and ancestral characteristics of land plants. *BMC Genomics*, 17, pp.267-289.
- van der Burgt, A., Severing, E., de Wit, P. and Collemare, J. (2012). Birth of New Spliceosomal Introns in Fungi by Multiplication of Introner-like Elements. *Current Biology*, 22, pp.1260-1265.
- Verhelst, B., Van de Peer, Y. and Rouzé, P. (2013). The Complex Intron Landscape and Massive Intron Invasion in a Picoeukaryote Provides Insights into Intron Evolution. *Genome Biology and Evolution*, 5, pp.2393-2401.
- Worden, A., Lee, J., Mock, T., Rouze, P., Simmons, M., Aerts, A., Allen, A., Cuvelier, M., Derelle, E. and Everett, M. (2009). Green Evolution and Dynamic Adaptations Revealed by Genomes of the Marine Picoeukaryotes *Micromonas*. *Science*, 324, pp.268-272.
- Xiong, Y. and Eickbush, T. H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.*, 9, pp.3353-3362.

Yenerall, P. and Zhou, L. (2012). Identifying the mechanisms of intron gain: progress and trends. *Biology Direct*, 7, pp.29.

http://images.slideplayer.com/23/6905003/slides/slide_7.jpg.31.8.2017.

http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/ECB/CH07/7_16.jpg.31.8.2017.

7. Sažetak

Otkriće introna, a kasnije i njihove funkcije u genomu, značilo je početak boljeg razumijevanja prirode *eng.* „junk DNA“ te regulacije genske ekspresije kod eukariota. Samo podrijetlo introna zasad je slabo istraženo. Najnoviji model prijenosa uz pomoć transpozonskih elemenata nudi obećavajući mehanizam za neke od introna nastalih u novije vrijeme.

Intronski elementi (*eng.* Introner Element, IE) kod *M. pusille* i *A. anophagefferens* pronađeni su u velikom broju, te ne pokazuju međusobnu sličnost u sekvencama. Mehanizam njihove ugradnje, koji uključuje formiranje jednog mjesta izrezivanja unutar invertnog rubnog ponavljanja (*eng.* Terminal Inverted Repeat, TIR) u intronu, te drugog mjesta izrezivanja unutar dupliciranog ciljnog mjesta (*eng.* Target Site Duplication, TSD) u eksonu, osigurava pravilno izrezivanje intronskog elementa bez narušavanja struktura i funkcija proteina kodiranih susjednim eksonima. Sličnost s DNA transpozonom vidljiva je u formiranju TSD-a dugih 3 pb kod *M. pusille* i 8 pb kod *A. anophagefferens*, budući da DNA transpozoni prilikom svoje ugradnje stvaraju direktna ponavljanja i cik-cak ureze. Zbog toga što su kratki i ne sadržavaju okvire čitanja za kodiranje transpozaze, pripadaju skupini neautonomnih DNA transpozona.

S obzirom na relativnu jednostavnost mehanizma te sveprisutnost DNA transpozona kod eukariota, postoji mogućnost da ovaj način nastanka introna nije rezerviran samo za nedavne događaje, već se odvijao i prije u evoluciji. Međutim, mali broj otkrivenih introna ovog tipa navodi nas na zaključak kako je vjerojatno prije riječ o iznimci nego pravilu, te da ovaj mehanizam najvjerojatnije ne može opisati nastanak većine introna. Valja istražiti prisutnost i učestalost ovog mehanizma u ostalim organizmima, te pronaći alternativne načine ugradnje introna.

8. Summary

The discovery of introns and their function in a genome was of great importance for better understanding the nature of junk DNA and their role in regulation of gene expression in eukaryotes. Their origin, however, is not well understood. A new model, that explains their motion through transmission of transposable elements, is believed to explain recent intron gain.

Introner Elements (IEs) of *M. pusilla* and *A. anophagefferens* were found in a great number of copies and show lack of sequence similarity. The proposed mechanism is based on the discovery that every IE carries one splice site at the end of Terminal Inverted Repeat (TIR) and another splice site at Target Site Duplication (TSD) sequence. The introns are removed perfectly, without altering protein structure and function. The elements being inserted that generate 3 bp long TSDs in *M. pusilla* and 8 bp long TSDs in *A. anophagefferens* are similar to DNA transposons, which are known to form direct repeats while inserting into DNA. IEs are small and non-autonomous DNA transposons that contain no open reading frames, making them reliable upon transposases encoded elsewhere in genome.

Due to simplicity of this mechanism and ubiquity of DNA transposons, it is important to explore the possibility of that kind of intron gain happening earlier in evolution. Considering that a small number of those introns has been found, this mechanism probably isn't the main source of their generation. It is essential to determine their frequency in other organisms, or some alternative mechanisms for their insertion.