

Ribozimi

Pereković, Lovorka-Kristina

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:217:495633>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lovorka – Kristina Pereković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

RIBOZIMI

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, godina 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. rujna 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: [titula, ime i prezime mentora]

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD	1
§ 2. KATALITIČKA SVOJSTVA RIBOZIMA.....	3
2.1. Samocijepajući ribozimi	4
2.1.1. Hammerhead ribozim.....	6
2.1.2. Hairpin ribozim	8
2.1.3. Hepatitis delta virus ribozim	9
2.1.4. Neurospora Varkud satellite ribozim	10
2.2. Introni grupe I.....	12
2.3. Introni grupe II	15
2.4. Ribonukleaza P	17
2.5. Ribosomi.....	18
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXI

§ Sažetak

Ribozimi su molekule RNA (eng. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina) koje kataliziraju kemijsku reakciju cijepanja ili ligacije. Kako bi ribozimi bili aktivni i obavljali svoje funkcije moraju se pakirati u visoko uređene tercijarne strukture. Ribozime dijelimo prema veličini i prema mehanizmu. U skupinu velikih molekula RNA, spadaju RNaze P, introni skupine I i II, koje koriste hidroksilnu skupinu riboze udaljenog ili vanjskog nukleotida kao nukleofil, a sudjeluju u procesu izrezivanja introna iz pre-tRNA i ligaciji eksona. Male molekule RNA, uključuju *hammerhead* (čekić), *hairpin* (ukosnica), *hepatitis delta virus* (HDV) i *Varkud satellite* (VS), cijepaju same sebe koristeći 2'-hidroksilnu skupinu na ribozu na čijem se 3'- kraju nalazi fosfodieterska veza koja podliježe cijepanju. Ribozimi najčešće grade strukture ukosnice ili čekićaste strukture te imaju jedinstvenu sekundarnu strukturu koja im omogućava cijepanje drugih RNA molekula na specifičnim sekvencama.

Ribozimi kataliziraju nekoliko centralnih reakcija koristeći najviše katalizu metalnim ionima i kiselinsko-baznu katalizu, ali i doprinose vezne energije, elektrostatsku katalizu, kovalentnu, te ponekad čak i organske kofaktore i sam supstrat kao pomoć u katalizi. U skupinu ribozima spadaju RNaza P i ribosom koji je među najbitnijim ribozimima u stanici.

§ 1. UVOD

Ribozimi su molekule RNA (eng. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina) koje kataliziraju kemijsku reakciju (RNA enzimi). Čvrsto prihvaćenovjerenje, da je kataliza rezervirana samo za enzime tj. proteine, dugo vremena dominiralo je biologijom. Prije otkrića ribozima, enzimi su bili jedini poznati biološki katalizatori. Kasnih šezdesetih godina počele su se javljati ideje koje su poslužile kao temelj za hipotezu RNA-svijetu. Tada je bilo poznato da se replikacija nukleinskih kiselina odvija pomoću proteinskih enzima, te da su za sintezu proteina potrebne nukleinske kiseline. Među prvim idejama provlačilo se pitanje, što se prije razvilo, enzimi koji djeluju na stanicu ili nukleinske kiseline koje sadrže informacije potrebne za proizvodnju enzima? Na ovo pitanje se može gledati kao na problem „pileta i jajeta“. Koncept „RNA kao katalizator“ zaobilazi taj problem jer RNA u suštini može biti oboje, i pile i jaje. Druga ideja se temeljila na otkriću da RNA može formirati kompleksne sekundarne strukture. Na temelju ove ideje 1967. godine su Carl Woese, Francis Crick i Leslie Orgel prvi sugerirali da RNA može djelovati kao katalizator. Godine 1980. Thomas Cech, na University of Colorado u Boulderu, je proučavao izrezivanje introna u prekursorima ribosomske RNA praživotinje *Tetrahymena thermophila*. Dok je pokušavao pročitati enzim odgovoran za reakciju alternativnog izrezivanja RNA, otkrio je da se introni mogu izrezati i u odsustvu ekstrakta stanica. Thomas R. Cech i njegove kolege koliko god da su pokušavali nisu mogli identificirati niti jedan protein povezan s reakcijom alternativnog izrezivanja RNA. Međutim, nakon mnogobrojnih neuspjelih pokušaja traženja proteina, Thomas R. Cech je dao novu ideju. Cech je predložio da intronska sekvenca RNA može pocijepati i reorganizirati fosfodieterske veze. Otprilike u isto vrijeme, Sidney Altman, profesor na Yale University, proučavao je kako se tRNA molekule obrađuju u stanici. Sidney Altman i njegove kolege su izolirali enzim RNaza-P, koji je odgovoran za pretvorbu prekursorne tRNA u aktivnu tRNA. Naime, na njihovo veliko oduševljenje, otkrili su da RNaza-P osim proteina sadrži i RNA te su došli do saznanja da je RNA esencijalna komponenta aktivnog enzima. Ideja je bila vrlo napredna pa su zbog toga imali poteškoća pri publiciranju njihovog otkrića. Nekoliko mjeseci poslije, Altman je demonstrirao da RNA može djelovati kao katalizator i u odsustvu proteinske komponente, dokazujući da podjedinica RNA u RNaza-P može katalizirati cijepanje prekursora tRNA u aktivnu tRNA. Godine 1989., Thomas R. Cech i Sidney

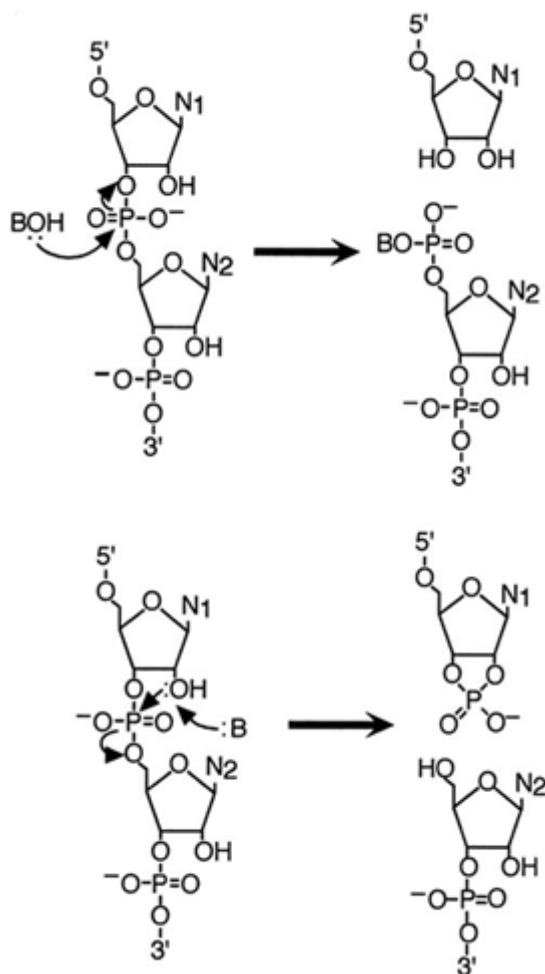
Altmansu podijelili Nobelovu nagradu za Kemiju za njihovo "otkriće katalitičkih svojstava RNA." Termin ribozim je prva predstavila Kelly Kruger godine 1982. u radu koji je publiciran u časopisu *Cell*. Nakon Cech-ovog i Altman-ovog otkrića, povodom njihove ideje, i drugi znanstvenici su otkrili mnoge druge primjere samocijepajuće RNA ili katalitičke RNA molekule.

Ribozimi najčešće grade strukture ukosnice ili čekićaste strukture te imaju unikatnu sekundarnu strukturu koja im omogućava cijepanje drugih RNA molekula na specifičnim sekvencama. Danas je poznata atomska struktura skoro svih ribozima (moguće je napraviti ribozime koji će specifično cijepati bilo koju RNA molekulu) što je pomoglo u razumijevanju reakcije RNA katalize. Prevladavajući mehanizam skoro svih ribozima je kiselo-bazna kataliza.

§ 2. KATALITIČKA SVOJSTVA RIBOZIMA

Katalitičke RNA uglavnom se dijele u dvije klase na temelju njihove veličine i mehanizama reakcije. U skupinu velikih katalitičkih molekula RNA spadaju RNaze P, introni skupine I i II. Velike RNA molekule kreću u rasponu od nekoliko stotina nukleotida pa do približno 3000. Male molekule RNA uključuju *hammerhead* (čekić), *hairpin* (ukosnica), *hepatitis delta virus* (HDV) i *Varkud satellite* (VS).^{1,2} Te se molekule kreću u veličini od ~35 do ~155 nukleotida. Temeljne reakcije nuklenskih kiselina su cijepanje i vezanje specifičnih sekvenci. Ribozimi u prirodi kataliziraju prijenos fosfata u dva tipa kemijskih reakcija koje se razlikuju u produktima. Male RNA koje same sebe cijepaju (eng. *self-cleaving RNA*) kataliziraju reverzibilnu reakciju cijepanja fosfodieterske veze koja daje 5'-hidroksilni kraj i 2'-3' ciklični fosfat kraj (Slika 1.a). Velike katalitičke RNA molekule kataliziraju cijepanje fosfodieterske veze iligacijske reakcije koje daju 5'-fosfatni i 3'-hidroksilni kraj (Slika 1.b). Obje vrste reakcija fosfatnogprijenosa se odvijaju inverzijom konfiguracije premošćujućeg fosfata uslijed nukleofilnog napada, što ukazuje na S_N2 tipmehanizma reakcije.

Odnos između veličine i mehanizma reakcije ovih molekula pokrenuo je intrigantna pitanja o njihovom podrijetlu i evoluciji. Može biti da su potrebni reakcijski mehanizam i veličina velikih ribozima kako bi se često vrlo udaljeni elementi supstrata doveli u neposrednu blizinu. Male RNA molekule koje su samocijepajuće nisu suočene s ovim ograničenjem i možda im je to omogućilo evoluciju manjih katalitičkih centara. Ipak je moguće da je odnos veličine i mehanizma reakcije jednostavno slučajan.²



Slika 1. Reakcije katalizirane RNA molekulom: reakcijski mehanizam velikih katalitičkih RNA molekula (*gore*); reakcijski mehanizam malih katalitičkih RNA molekula (*dolje*).

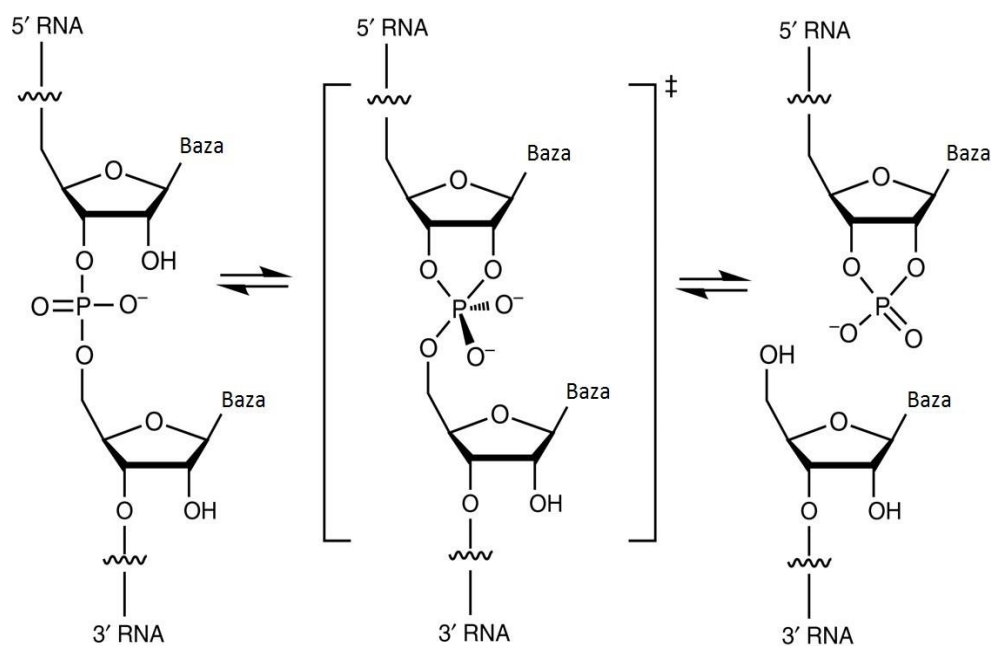
Slika preuzeta iz N. K. Tanner, *FEMS Microbiol. Rev.* **23** (1990) 257–275.

2.1. Mali samocijepajući ribozimi

Temeljne reakcije ribozima su cijepanje i ligacija fosfodiesterske veze specifičnih sekvenci. Pet malih samocijepajućih ribozima koji ih kataliziraju poznati su iz današnjih organizama : *hammerhead* (čekić), *hairpin* (ukosnica), hepatitis delta virus (HDV), *Neurospora Varkud satellite* (satelit Varkud, VS) i *glucosamine-6-phosphate synthase* (glukozamin-6-fosfat sintaza, glmS).^{1,3} Svaki od ovih pet ribozima ima jedinstvenu strukturu i građu aktivnog mjesta što omogućuje strukturno različitim RNA molekulama katalizirati istu kemijsku

reakciju. Nedavno otkriveni motivi ribozima su *twister* (vrtlog), *twister sister* (sestra vrtloga), *pistol* (pištolj) i *hatchet* (sjekirica).¹

Ovi prirodni ribozimi kataliziraju intramolekularne reakcije, gdje RNA prolazi kroz razgradnju koja je katalizirana bazom putem reakcije transesterifikacije.³ U toj transesterifikacijskoj reakciji cijepanja 2'- kisik nukleofilno napada susjedni 3'- fosfor gdje nastaje ciklički produkt 2', 3'- fosfat na 3'- kraju i slobodnu hidroksilnu skupinu na 5'- kraju. Reakcija transesterifikacije se odvija usklađenim S_N2 mehanizmom gdje su 2'- kisik, fosfor i 5'- kisik u istoj ravnini.³(Slika 2.) Reakcija je katalizirana deprotoniranjem 2'- hidroksilne skupine, stoga porastom pH dolazi do ubrzanja reakcije. Deprotonirani 2'- kisik tada stvara slabu vezu sa susjednim 3'- fosforom te se reakcija nastavlja kroz prijelazno stanje trigonalnog bipiramidalnog oksifosforana. U prijelaznom stanju su nukleofil 2'- kisik i izlazna skupina 5'- kisik smješteni na suprotnom vrhu i poravnati sa 2'- fosforom na jednom pravcu. Reakcija završava formiranjem kovalentne veze između 2'- kisika i 3'- fosfora te pucanjem 3' – 5' fosfatne veze.⁴



Slika 2. Reakcija transesterifikacije katalizirana ribozimima (*hammerhead*, *hairpin*, HDV, VS, glmS). Slika preuzeta iz A. R. Ferre'-D'Amare' *et al.*, *Banbury Rep.* **2** (2010) 1-10.

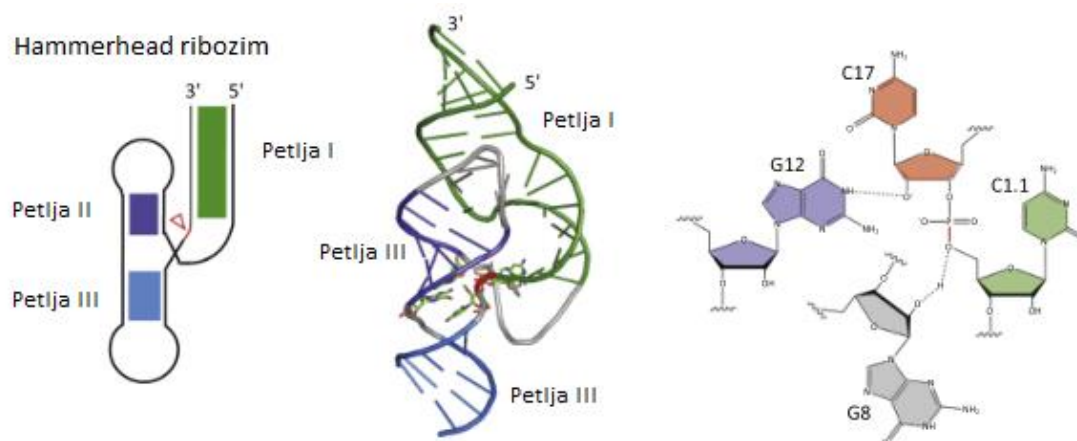
Ovi ribozimi isto tako mogu vršiti i reakciju reverzibilne ligacije koja je također kiselo-bazna, ali u ovoj reakciji 5'- kisik je nukleofil koji napada ciklički fosfat. U reakciji reverzibilne ligacije je uključena baza koja deprotonira 2'- hidroksilnu skupinu kako bi se aktivirao 2'- kisik (nukleofil), a kiseline protonira 5'- kisik izlazne skupine. Mali samocijepajući ribozimi uglavnom koriste nukleotidne funkcionalne grupe kao opće kiseline i baze te ih zato nazivamo i nukleolitičkim ribozimima. HDV je jedini ribozim iz skupine malih samocijepajućih ribozima koji koristi metalni ion u aktivnom mjestu da bi djelovao kao opća baza.

Mali nukleolitički ribozimi se od ostalih ribozima razlikuju u dva aspekta. Prva i glavna razlika je što mali samocijepajući ribozimi koriste unutarnje nukleotidne skupine kao svoje nukleofile, dok drugi ribozimi koriste neke druge molekule (grupa II introna) ili vanjske molekule (grupa I introna, RNaza P i ribosom). Druga razlika se temelji na tome da su opća baza i kiselina dio ribozima, njihove funkcionalne grupe, dok ostali ribozimi koriste metalne ione.

2.1.1. *Hammerhead ribozim*

Hammerhead ribozim je mali samocijepajući ribozim, prvobitno otkriven u viroidima i virusoidima, koji katalizira reakciju izomerizacije specifične fosfodieterske veze prilikom replikacije. Ovaj ribozim je bio fokus više studijskih istraživanja nego bilo koja druga katalitička RNA, unatoč tome, kompletno razumijevanje reakcijskog mehanizma je i dalje nepotpuno. *Hammerhead* ribozim katalizira identične kemijske reakcije kao *ihairpin* ribozim iako imaju drugačije strukture i drugačije biokemijske osobine, uključujući različite ovisnosti o pH i metalnim kationima u katalizi reakcije RNA ligacije.⁵ Najjednostavniji *hammerhead* ribozim ima katalitički centar koji se sastoji od 15 nukleotida okruženih sa tri dvostruke uzvojnice (Slika 3. Označene su I, II, III). Ta sekundarna struktura ribozima podsjeća na oblik glave morskog psa čekićara. Ovisno o otvoru spirale postoje tri moguća kružno permutirana oblika, nazvani tip I, II i III. Uzvojnice II i III su smještene paralelno, a uzvojnica I je smještena pod oštrim kutem u odnosu na uzvojnica II.^{1,3-5} Riješena kristalna struktura otkriva jezgru zarobljenu u otvorenom ili predkatalitičkom stanju kojoj je potrebno značajno uređivanje kako bi se esencijalni ostaci postavili u položaj „in-line“ te kako bi došlo do nukleofilnog napada. Pretpostavljalo se da ta struktura predstavlja osnovno stanje. Međutim,

kasniji mehanički i strukturni podaci su bili kontradiktorni sve do otkrića distalnog tercijarnog kontakta (između zavojnice I i II) koji potpomaže znatno brže cijepanje, jer stabilizira katalitički kompetentnu konformaciju aktivnog mjesta. Globalna struktura ribozima ima oblik slova Y, a sastoji se od usporednog snopa zavojnica III i II koji se pakiraju pored zavojnice I (slika 3B). Ta struktura optimalno pozicionira ostatke uključene u opću kiselinsko-baznu katalizu te nukleofil koji napada fosfat.¹ U predloženom modelu katalize, uključuju se samo nukleotidi koji izravno sudjeluju u katalizi. Dio iskrivljene okosnice potpomaže mjestu cijepanja te se na veznim mjestima II i III, u džep aktivnog mjesta, smješta nukleotid C17. Nukleotidi G8 i G12 služe kao opća kiselina odnosno kao opća baza. Nedavno je otkriveno preko kristalne strukture da se u aktivnom mjestu nalaze tri natrijeva kationa (Na^+), od kojih je jedan vezan na G12 i uključen u stabilizaciju negativnog naboja deprotoniranog nukleotida N1. Nukleotid N1 ionizirane forme G12 odvlači 2'- vodik od nukleofilnog kisika C17, te tako 2'- kisik postaje pozicioniran za „in-line“ nukleofilni napad na fosfat C1 (Slika 3b). Ribozu G8 stvara vodikove veze sa 5'- kisikom i donira proton odlazećoj skupini. Ovaj predloženi mehanizam je jedinstven po tome što koristi nukleobazu i ribozu, struktura kojoj je puno lakše formirati aktivno mjesto, te doprinosi visokoj učestalosti s kojom se ovaj samocijepajući ribozim nalazi u prirodi.¹



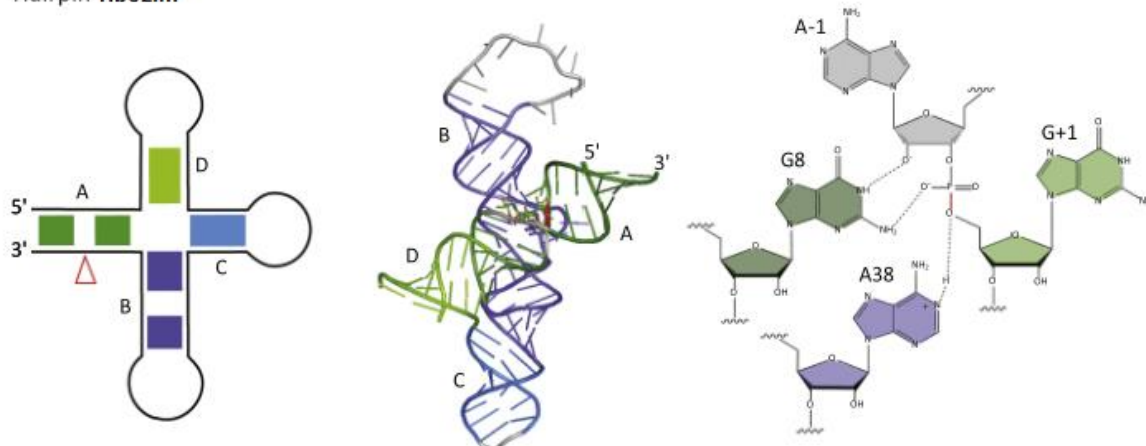
Slika 3. Hammerhead ribozim: sekundarna struktura (*lijevo*); tercijarna struktura (*sredina*); katalitičko mjesto (*desno*). Slika je adaptirana iz R. M. Jimenez *et al.*, *Trends Biochem.*

Sci. **40**(2015) 648-661.

2.1.2. Hairpin ribozim

Ribozim ukosnice, kao i čekičasti ribozim, je pronađen u viroidima i virusoidima. Ovaj ribozim katalizira reakcije cijepanja i ligacije kako bi nastali produkti virusne replikacije genoma. Za razliku od čekičastog ribozima, ribozim ukosnice ne zahtjeva metalni ion za reakciju. Sekundarna struktura ribozima ukosnice sastoji se od četiri dvostruke uzvojnice (A, B, C, D) koje su usidrene u oblik četverosmjernog raskrižja. Zavojnice A i B tvore domenu koje imaju spirala-petlja-spirala motiv.⁵ Te dvije domene su kovalentno vezane fosfodieterskom vezom. Zavojnice A i B tvore unutarnji džep, tj. aktivno mjesto, u kojemu se nalazi fosfat koji se cijepa te nukleotidi koji su neophodni za katalizu, a uzvojnice C i D pružaju strukturnu stabilnost i ne sudjeluju u katalizi. Dva funkcionalno važna purina A38 i G8 su optimalno pozicionirani za ulogu opće baze i opće kiseline. G8 je na nasuprotnom lancu od fosfata u petlji A te ima ulogu opće baze kako bi aktivirao nukleofilni 2'- kisik, dok je A38 unutar petlje B te funkcionira kao opća kiselina i donira protor 5'- kisik odlazećoj skupini prilikom reakcije cijepanja. Studije pojedinačnih molekula su otkrile da je interakcija petlja-petlja vrlo dinamična i da oscilira između antiparalelnih (aktivni oblik) i paralelnih (neaktivni oblik) stanja. Eksperimentalni dokazi ukazuju na kombinaciju barem 4 mehanizma ovog ribozima : precizna orijentacija supstrata, preferentno vezanje prijelaznog stanja, elektrostatska kataliza i kiselo-bazna kataliza.³ U reakciji ligacije nukleotid G8 djeluje sada kao baza, dok A38 ima ulogu kiseline.

Hairpin ribozim

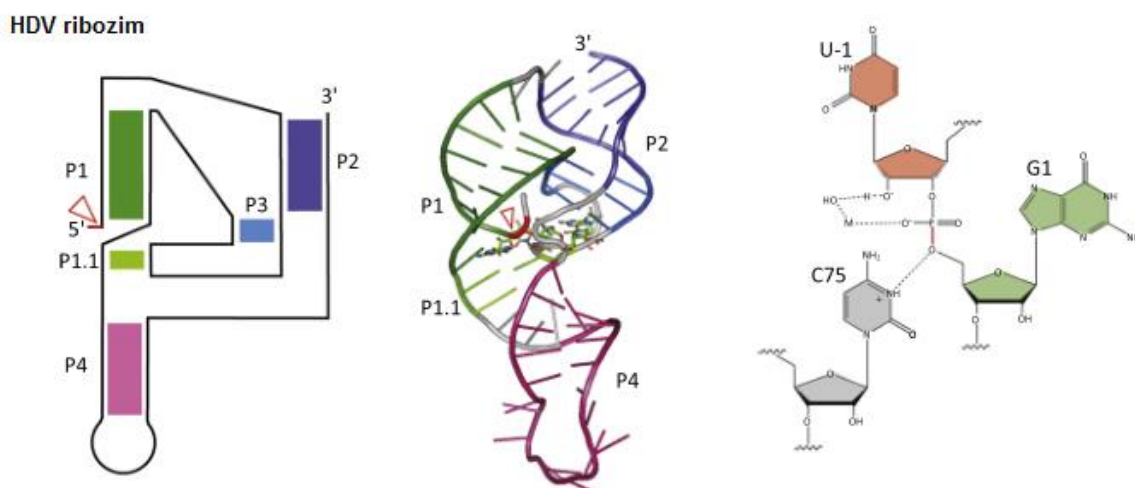


Slika 4. Hairpin ribozim: sekundarna struktura (lijevo); tercijarna struktura (sredina); aktivno mjesto (desno). Slika je adaptirana iz R. M. Jimenezet al., *Trends Biochem. Sci.* **40**(2015) 648-

661.

2.1.3. Ribozim iz *Hepatitis delta virusa*

Ribozim *Hepatitis delta virus* (HDV) je virusna jednolančana RNA, dugačka oko 1700 nukleotida, izolirana u hepatocitima čovjeka zaraženog sa hepatitis B virusom. HDV ribozim katalizira reakciju samocijepanja kako bi nastali produkti koji su potrebni za replikaciju virusnog genoma. Replikacija proizvodi linearne multimerne, genomske i antigenomske RNA, u kojima su kodirani HDV ribozimi za cijepanje multimera u pojedinačne genome odgovarajuće veličine. Druge biološke uloge HDV ribozima sugeriraju da je njihova aktivnost regulirana, da utječe na okolinu transkripta te je povezan sa fenotipom kod ljudi. Sekundarna struktura prikazuje pet dvostrukih uzvojnica (označene P1- P4) koje formiraju dva usporedna snopa koji su spojeni jednolančanom regijom koja sadržava dva para baza (označeno P1.1).² Kristalnom strukturom genoma HDV ribozima utvrđeno je da sekundarna struktura formira dvostruku pseudopetlju. Pseudopetlja je struktura nukleinske kiseline koju karakterizira sparivanje baza među nukleotidima u petlji strukture ukosnice s komplementarnim bazama izvan ukosnice. Zavojnice P1 i P2 formiraju jednu pseudopetlju, P3 i P1.1 drugu, te konačno te dvije pseudopetlje zajedno stvaraju treću pseudopetlju između P1 i P1.1. (Slika 5.). Aktivno mjesto ribozima sadržava P1.1, P3 i vezne regije, dok P1, P2, P4 stabiliziraju strukturu ribozima.¹ Strukturni i mehanistički dokazi upućuju na to da HDV ribozim jedini koristimolekulu vode vezanu na divalentni metalni ion kao opću bazu i nukleotid citozin C75 kao opću kiselinu. Metalni kation stabilizira nastali negativni naboj na 2'- nukleofilu, olakšavajući deprotonaciju općom bazom, te također potencijalno stabilizira prijelazno stanje peterovalentnog fosfora. U odsutnosti dvovalentnog kationa, drastična promjena pK_a nukleobaze C75 može biti dovoljna za stabilizaciju negativno nabijenog nukleofila te se kiselo-bazna kataliza nastavlja odvijati bez posredovanja dvovalentnim kationom. Ovaj mehanizam je jedinstven među prirodnim samocijepajućim ribozimima zato što zahtijeva i dvovalentni metalni ion i citozin u aktivnom mjestu, dok ostali motivi ribozima koriste samo nukleotide za katalizu.^{1,3}

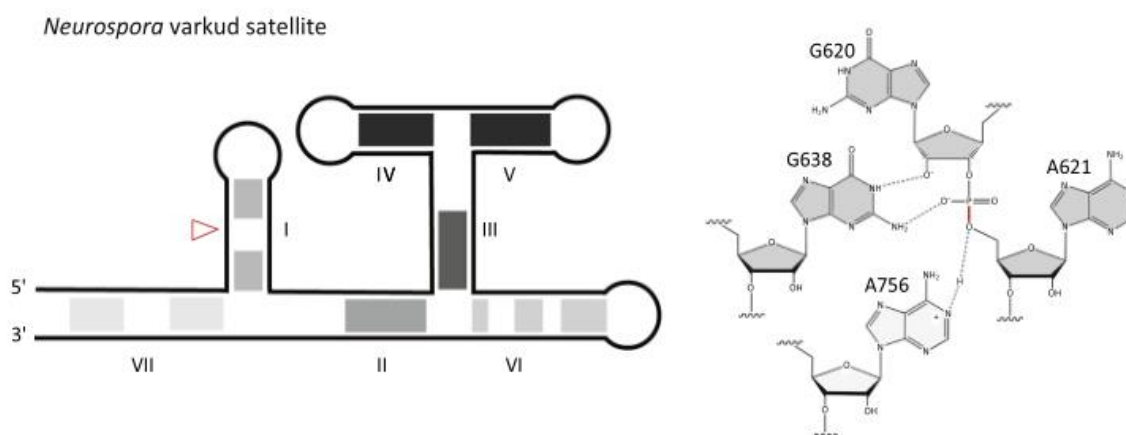


Slika 5. HDV ribozim: sekundarna struktura (*lijevo*); terciarna struktura (*sredina*); katalitičko mjesto (*desno*).Slika je adaptirana iz R. M. Jimenez *et al.*, *Trends Biochem. Sci.***40**(2015) 648-661.

2.1.4. *Neurospora Varkud satellite ribozim*

Varkud satellite ribozim roda *Neurospora* je otkriven u bogatsvu mitohondrijske RNA te je uključen u procesiranje replikacijskih intermedijera. Dugačka je samo 154 nukleotida. Sekundarna struktura ovog ribozima se sastoji od sedam dvostrukih uzvojnica (I-VII) koji tvore tri trosmjerna čvora (I, VII, II), (II, VI, III) i (III, V, IV)(Slika 6.)¹ Interakcije između petlji, lanac-petlja (*stem-loop*, SL), I i V olakšava spajanje unutarne zavojnice I sa unutarnjom zavojnicom VI stvarajući aktivno mjesto. Interakcije potiču konformacijsku promjenu u zavojnici I koja je nužna za aktivnost ribozima. Pretpostavlja se da su katalitički centri VS ribozima smješteni u izbočenoj petlji A730 zavojnice VI. Difrakcijom rendgenskih zraka je otkriveno da su A756 (lanac VI) i G638 (lanac I) smještene blizu fosfata koji se cijepa, odnosno aktivnog mjesta.¹ Biokemijski dokazi sugeriraju da se A756 ponaša kao opća kiselina, a G638 kao opća baza tijekom katalize. Istisnuti bazni par između G620 i A638, i istisnuti bazni parovi između G638 i A621 te G638 i A622, pomažu u deprotonizaciji 2'-kisika u blizini opće baze. Kataliza VS ribozima je analogna katalizi ribozima ukosnice, gdje gvanozin i adozin također olakšavaju kiselo-baznu katalizu. Kristalna struktura intermedija *Neurospora* pri 3.1 Å otkriva način povezivanja RNA, u kojem jedna domena iz monomerne

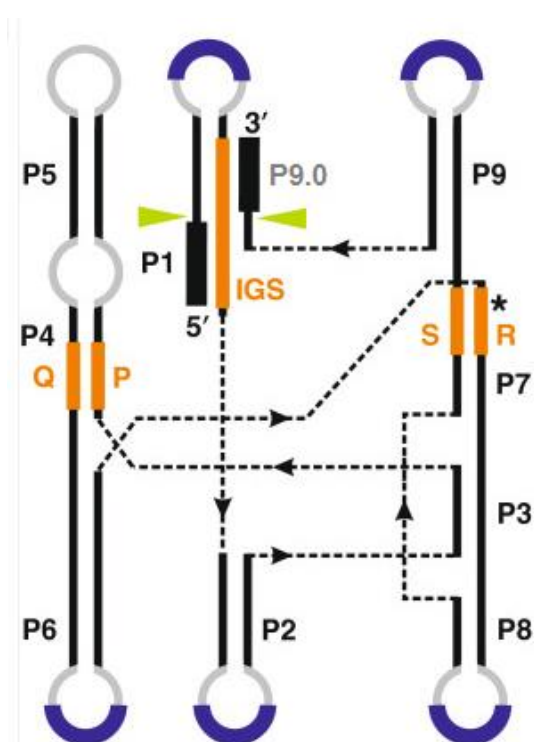
RNA zamjenjuje istu domenu iz istog lanca RNA što rezultira isprepletenim dimerom (izmjenom supstratnih zavojnica).⁶



Slika 6. *Neurospora varkud* satellite ribozim: sekundarna struktura(lijevo); aktivno mjesto (desno) Slika je adaptirana iz R. M. Jimenezet *al.*, *Trends Biochem. Sci.* **40**(2015) 648-661.

2.2. Introni grupe I

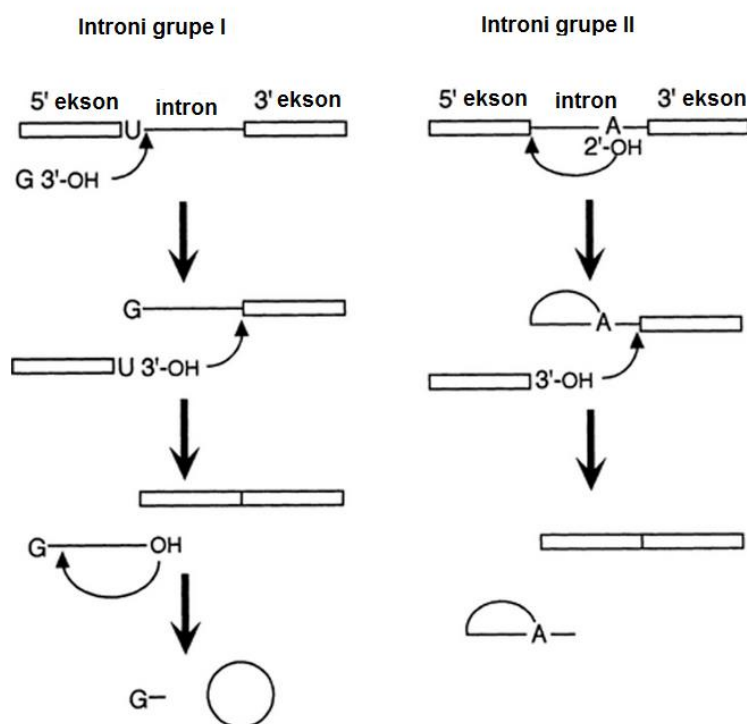
Introni grupe I su veliki samo-izrezujući ribozimi. Kataliziraju izrezivanje samih sebe iz prekursora mRNA, tRNA i rRNA u širokom spektru organizama. Introni grupe I mogu varirati u veličini, pa čak od nekoliko stotina do nekoliko tisuća nukleotida, ali to i dalje ne utječe na njihovu sekundarnu strukturu. Sekundarna struktura se sastoji od devet dvolančanih zavojnica (P1-P9) koji sadržavaju sparene baze te se smještaju u 3 domene (P1,P2) (P4-P6) (P3-P9)(Slika 7.). Svaka domena ima paralelne odnosno usporedne zavojnice. Veznu domenu za supstrat stvaraju P1 i P9.0 tako da se 5'-kraj i 3'-kraj pozicioniraju vrlo blizu. Aktivnu srž ribozima introna grupe I stvaraju P4, P5 i P6, a katalitičku domenu stvaraju P3, P7, P8 i P9 dvostruke uzvojnice.⁷



Slika 7. Sekundarna struktura introna grupe I. Slika preuzeta iz G. Hausneret *al.*, *Mobile DNA* 8 (2014) 1-12.

Mehanizam samo-izrezivanja introne grupe I se odvija u dvije reakcije transesterifikacije. U katalitičkoj domeni, na P7 spiralnom lancu, se nalazi džep za vezanje gvanozin-5'-trifosfata (GTP). Vezanjem vanjskog gvanozina (α GTP) dolazi do

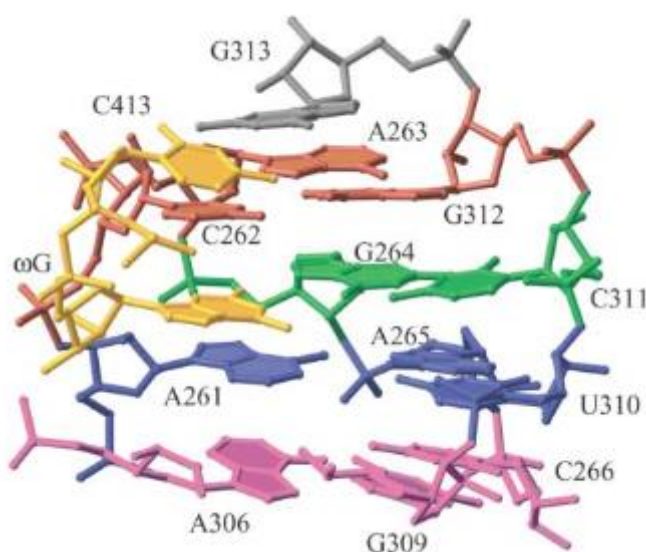
konformacijske promjene gdje slobodna 3'-hidroksilna skupina α GTP može vršiti nukleofilni napad na 5' – 3'-fosfodistersku vezu na 5'-kraju u zavojnici P1. Nakon prve reakcijetransesterifikacije stvara se slobodna 3'-hidroksilna skupina na 5'-kraju eksona i 5'-G vezanim intronom. Nakon ove reakcije transesterifikacije dolazi do konformacijskih promjena koje omogućavaju zamjenu α GTP sa 3' terminalnim gvanozinom (ω G) iz oslobođenog eksona. U drugoj reakciji transesterifikacije slobodna 3'-hidroksilna skupina ω G nukleofilno napada fosfat na 3'-mjestu izrezivanja. Tom reakcijom transesterifikacije dolazi do ligacije ta dva eksona i dolazi do oslobađanja izrezanog introna.⁸ (Slika 8.) Istraživanjem kristalne strukture ovih ribozima dobiveni su dokazi da za ovu katalitičku reakciju su potrebna najmanje dva dvovalentna metalna iona koja se nalaze u aktivnom mjestu.⁹



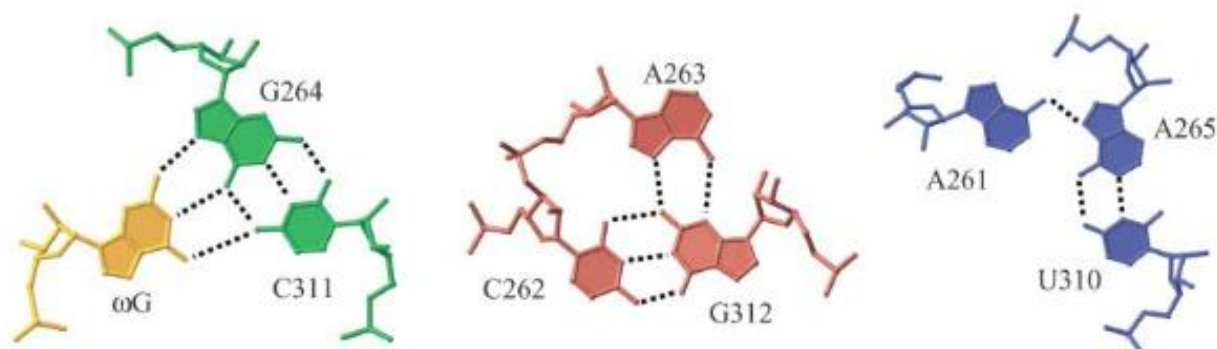
Slika 8. Mehanizam samo-izrezivanja kod introna grupe I i II. Slika je adaptirana iz N. K. Tanner, *FEMS Microbiol. Rev.* **23** (1990) 257–275.

Aktivno mjesto se sastoji od četiri međusobno nadslojenih tripleta baza (Slika 9.). T.R. Cech je otkrio da u intronu *Tetrahymena* gvanozin (α GTP ili ω GTP) stvara koplanarni bazni triplet (G-triplet) sa G264-C311 baznim parom (slika 10.).¹⁰ Iznad G-tripleta se baza nukleotida C262 veže sa G312 te baza nukleotida G312, koja stvara mali džepić, vodikovom vezom veže A263. Ispod G-tripleta baza nukleotida A261 dodiruje veći džep baznog para

A265-U310. Ispod tog tripleta se nalazi još jedan sloj baza, nukleotid A306 dodiruje veliki džep baznog para C266-G309 i tako formira posljednju bazu tripleta. Na ovakav način se baze naslaguju jedna na drugu kako bi stabilizirale gvanozin pri stvaranju vodikovih veza u baznom paru G-C.¹¹ U aktivno mjesto ribozima se vežu dva dvovalentna metalna iona, kako je već navedeno, da bi djelovali kao baza i kiselina, odnosno da bi deprotonirali nukleofil i protonirali 3'-kraj izlazne skupine.



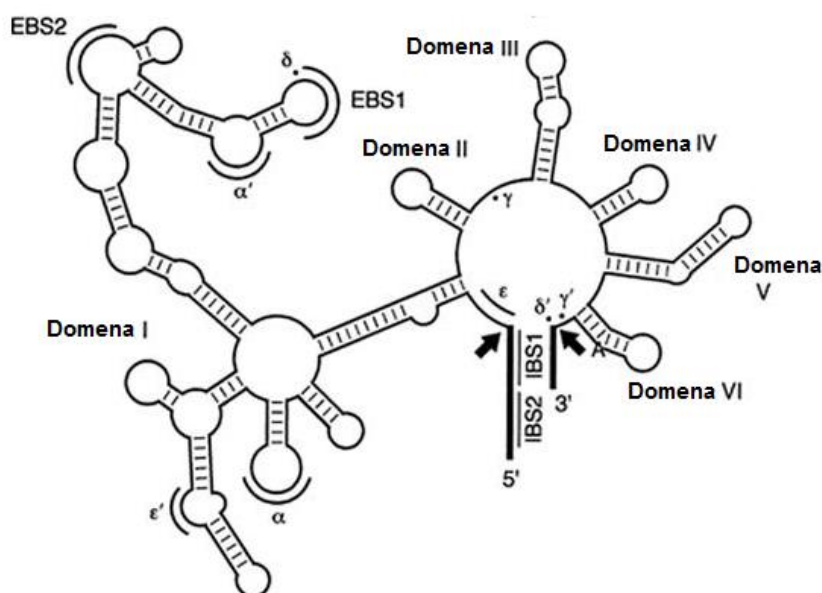
Slika 9. Aktivno mjesto ribozima introna grupe I. Slika preuzeta iz M. R. Stahley *et al.*, *Science* **309** (2005)1587-1590



Slika 10. Koplanarni bazni tripleti: G-triplet (*lijevo*); gornji triplet (*sredina*): C262 veže G312 te vodikovom vezom je vezan A263; donji triplet (*desno*): A265 veže U310 te vodikovom vezom je vezan A261. Slika preuzeta iz F. Guo *et al.*, *Molecular Cell* **16**(2004) 351-362.

2.3. Introni grupe II

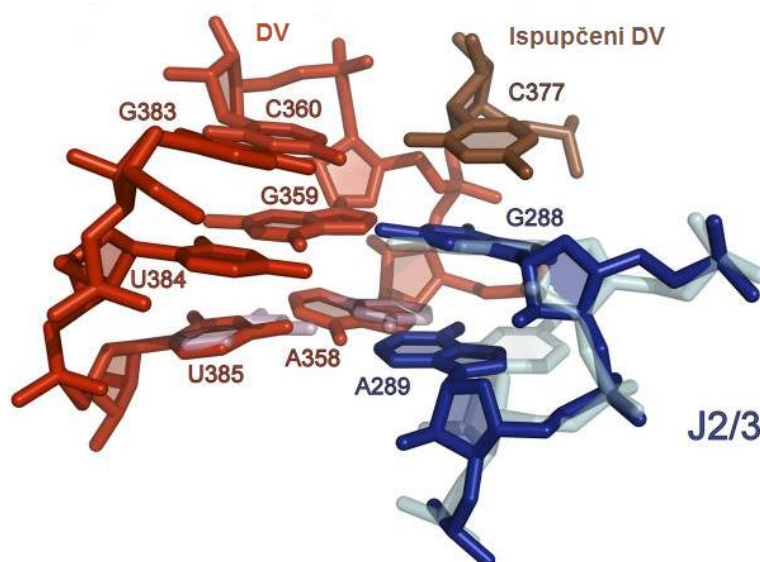
Introni grupe II kao i introni grupe I su veliki samo-izrezujući ribozimi, veličine od nekoliko stotina do približno 2500 nukleotida. Introne grupe II prvenstveno nalazimo u primarnim transkriptima mitohondrijskih i kloroplastih mRNA u gljiva, algi i biljaka, a rijetko u bakterijama. Ovi ribozimi se izrezuju iz prekursorske mRNA i spajaju ligacijom eksone koji ih okružuju, bez pomoći proteina. Primarna struktura introna grupe II ima male sličnosti u nukleotidnom slijedu s introni grupe I. Sekundarna struktura se sastoji od 6 helikalnih domena (D1-D6) koje grade konzerviranu terciarnu strukturu (Slika 11.). Domena I (DI) je najveća domena, koja sadrži gornju (κ) i donju (ζ) polovicu. Donja polovica DI ima motiv ϵ' koji je povezan sa aktivnim mjestom, dok gornja polovica sadržava sekvence koje vežu 5' i 3' eksone u aktivnom mjestu.¹² Domene DII i DIII su male domene koje strukturno doprinose te su nužne za katalitičku aktivnost. Domena D4 regulira mobilnost introna. Domena D5 je najkonzerviranija regija na kojoj se nalazi aktivno mjesto. Trijade nukleotida se nalaze u aktivnom mjestu te vežu katalitičke važne magnezijeve ione (Mg^{2+}). Domena D6 sadržava mjesto grananja, odnosno nukleotid adenozin koji sa slobodnom 2'-hidroksilom skupinom nukleofilno napada 5' – 3'-fosfodiestersku vezu na 5'-kraju mjesta izrezivanja. Iako su svi introni grupe II vrlo slični po svojoj sekundarnoj strukturi, razlikuju se po specifičnim varijacijama stoga su podjeljeni u tri glavne podskupine: IIA, IIB, i IIC.¹²



Slika 11. Sekundarna struktura introna grupe II. Slika je adaptirana iz N. K. Tanner, *FEMS Microbiol. Rev.* **23** (1990) 257–275.

Mehanizam samo-izrezivanja introna grupe II se odvija u dvije reakcije transesterifikacije kao i kod introna grupe I (Slika 8.). U prvom koraku slobodna 2'-hidroksilna grupa ispučenog adenoza napada 5'-3' fosfodietersku vezu na 5'-kraju mjesta izrezivanja što dovodi do nukleofilnog napada 3'-hidroksilne skupine na 3'-kraj mjesta izrezivanja. U ovom koraku se formira razgranati intermedijer omče koji je povezan 2-5' i 3'-5'-fosfodieterskom vezom na razgranatom adenzinu na domeni DVI. U drugom koraku slobodna 3'-hidroksilna skupina na 5'-kraju eksona vrši nukleofilni napad na 3'-kraj mjesta izrezivanja kako bi ligacijom nastali eksoni i otpustili se introni (u obliku omče).¹¹ Prva kristalna struktura introna grupe II je riješena za *Oceanobacillus iheyensis* (u poslijekatalitičkom stanju) u podgrupi IIC tek 2005. godine. Ta struktura je otkrila da se reakcije samo-izrezivanja odvijaju uz djelovanje dva dvovalenta metalna iona.¹³

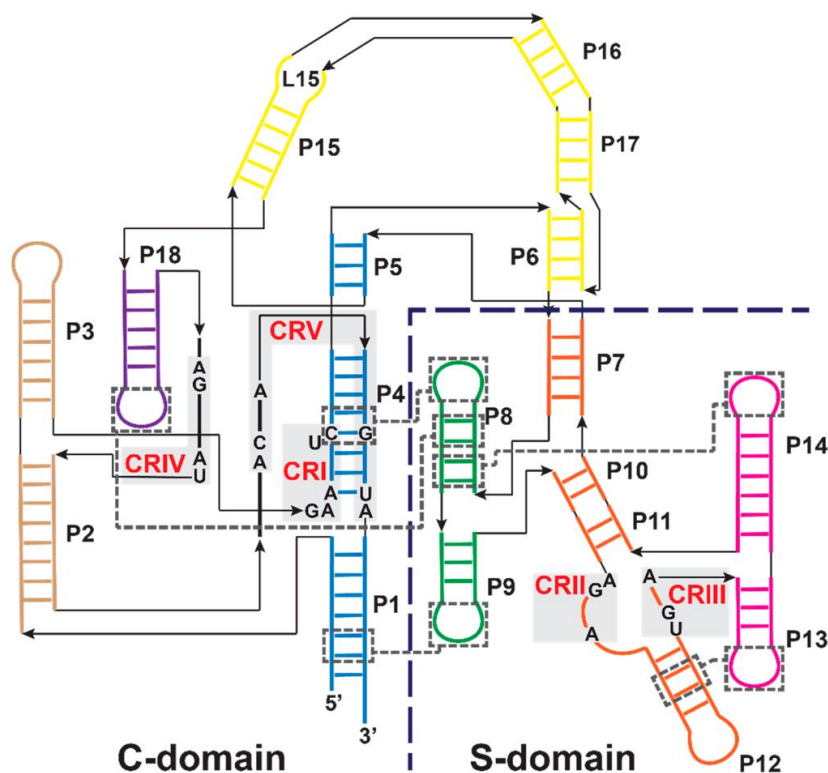
Aktivno mjesto introna grupe II sačinjavaju domene DI, DV i D6 te J2/3 poveznica (poveznica J2/3 se nalazi između domene DII i DIII). Domena DI dovodi napadajući nukleofil te pomaže usidriti 5'-kraj i 3'-kraj izrezujućeg mjesta u domenu DV kroz interakcije (κ - κ' , ζ - ζ' , λ - λ' i ϵ - ϵ'). Domena DV je najviše konzervirana domena te ujedno najbitnija za katalizu. U aktivnom mjestu domene DV se nalaze katalitičke trijade AGC sekvenci i DV ispučenje te vezni džep za dvovalentne metalne ione koji sudjeluju u katalizi. Formiranu trolančanu uzvojnica sa katalitičkom trijadom čine ispučenje DV i poveznica J2/3. Takva uzvojnica dovodi u katalitički važne sekvence u blizini.^{12,14}



Slika 12. Aktivno mjesto introna grupe II. Slika adaptirana iz K. S. Keating *et al.*, *RNA* 16 (2010) 1-9.

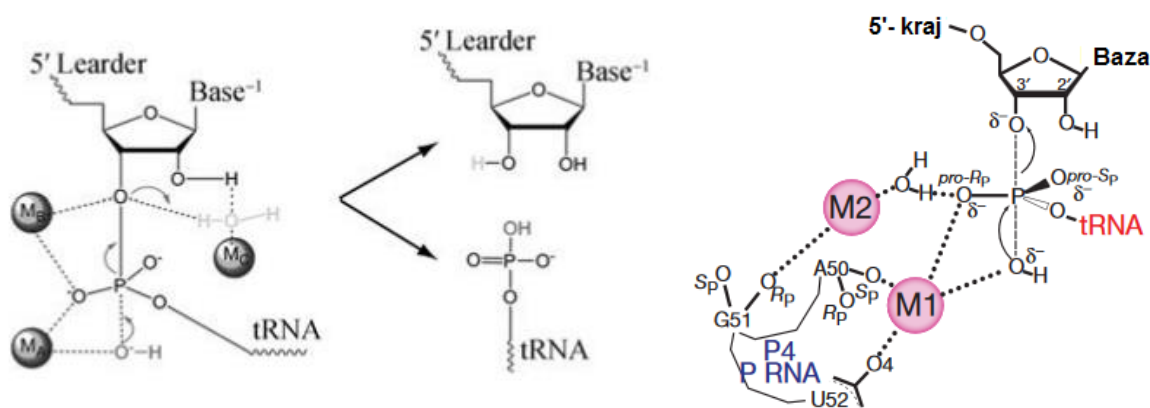
2.4. Ribonukleaza P

Ribonukleaza P, odnosno RNaza P je ribozim koji je prisutan u sve tri domene života; bakterijama, arheama i eukariotima. Ribonukleaza P je ribonukleoproteinski član ribozimske raznolikosti. Sastoji se od konzervirane RNA, duljine 350-400 nuklotida, i od jednog ili više proteina.¹⁵ Osnovni protein je neophodan za aktivnost *in vivo*, iako RNA podjedinica sama po sebi može katalizirati reakciju *in vitro*. RNaza P funkcioniše u intermolekularnoj reakciji i može procesirati tRNA, rRNA i mRNA supstrate. Struktura ribonukleaze P je kompaktna struktura koju čine paralelni spiralni lanci. Istraživanja strukture komponente RNA otkriva dvije domene, S domenu i C domenu, koje uključuju pet konzerviranih regija CRI- CRV (eng. *Conserved regions*, CR) koje su zajedničke ribonukleazama svih organizama (Slika 13.). Domena S je domena specifičnosti i ona je uključena u prepoznavanje supstrata pre-tRNA interakcijom sa T ψ C petljom, a domena C je katalitička domena koja prepoznaje pre-tRNA akceptorske zavojnice i 3'- CCA sekvence te katalizira reakciju hidrolize. Katalitičko mjesto ribozima čine pet konzerviranih regija, paralelne zavojnice P1-P4-P5, P2-P3, P8-P9 zajedno sa P15.¹⁶



Slika 13. Sekundarna struktura ribonukleaze P. Slika preuzeta iz N. J. Reiter *et al.*, *Nature* **468** (2010) 784-789.

U mehanizmu reakcije ribonukleaze P sudjeluje molekula vode koja nukleofilno napada fosfodistersku vezu. Mehanizam kojim se prekursor tRNA veže je još uvijek nepoznat. Kristalna struktura prikazuje kako su RNazi P isto potrebni dvovalentni metalni ioni kao i kod ostalih ribozima (Slika 14.). Metal 1 (M1) najčešće magnezij, stvara vezu između 5'- kraja tRNA i 3'- kisika na fosfatu koji se cijepa, kako bi djelovao kao baza te deprotonirao nukleofil. Nastaje Mg^{2+} - hidrat koji je nužan za početak reakcije. Metal 2 (M2) stabilizira trigonalno bipiramidalno prijelazno stanje fosfatne skupine preko molekule vode, te djeluje kao kiselina, odnosno protonira 3'-kraj izlazne skupine.^{16,18} Ovaj je mehanizam čest u svijetu katalitičkih RNA. Glavna uloga proteinske komponente RNaze P je interakcija i pozicioniranje vodećeg 5' nukleotidnog slijeda pre-tRNA u kompleks.¹⁷



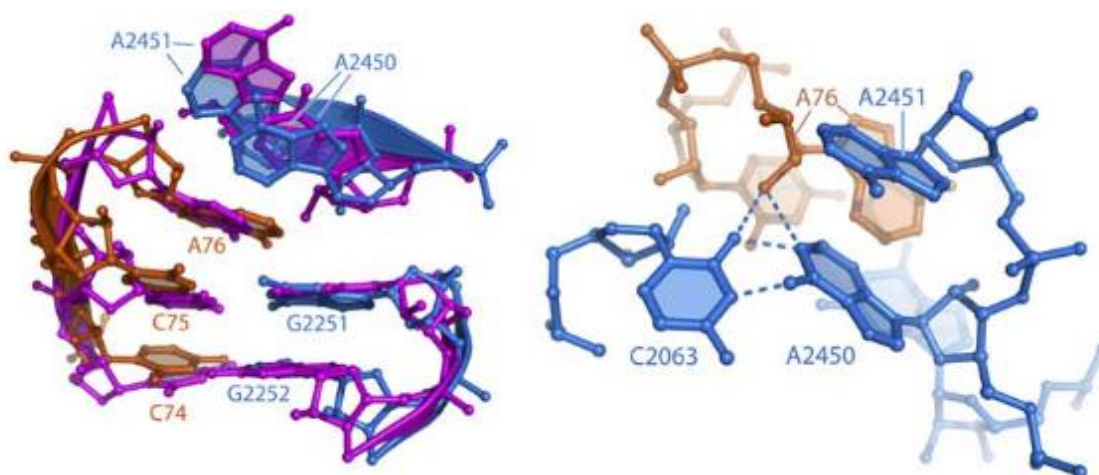
Slika 14. Mehanizam reakcije cijepanja fosfodiesterske veze uz pomoć metalnih iona.

Slika adaptirana iz Q. Wu *et al.*, *Sci. China. Ser. C: Life Sci.* **52** (2009) 232-244.

2.5. Ribosomi

Ribosom je ribozim koji katalizira stvaranje peptidne veze u proteinskoj sintezi, tj katalizira reakciju peptidil-tranferaze koje transliraju mRNA u proteine. Kod ribosoma α -amino skupina nukleofilno napada estersku, a formira amidnu vezu, što rezultira nastankom amida i slobodne hidroksilne skupine. Ribosomi imaju samo jednu trećinu ribosomskih proteina koji se nalaze na površini ribosoma, dok se u centralnoj poziciji strukture nalaze dvije trećine ribosomske rRNA. Ribosom se sastoji od dvije podjedinice, male (30S bakterije, 40S eukarioti) i velike (50S bakterije, 60S eukarioti). Bakterijski ribosomi (70S) su manji od

eukariotskih ribosoma (80S). U velikoj podjedinici se nalazi peptidil-transferazno aktivno mjesto, koje se sastoji samo od ribosomske RNA, za stvaranje peptidne veze, a mala podjedinica dekodira mRNA. U peptidil-transferaznom aktivnom mjestu se nalazi P mjesto u koje se veže tRNA koja je vezana za rastući peptidni lanac. Blizu aktivnog mjesta se nalaze tri skupine koje stvaraju vodikove veze sa napadajućom α -amino skupinom: 2'-hidroksilna skupina nukleotida A76 na tRNA u P mjestu, N3 skupina nukleotida A2486 (u *E. coli* A2451) na 23S rRNA i 2'-hidroksilna skupina nukleotida A2486 (Slika 15.). Ove vodikove veze možda su uključene u pozicioniranje α -amino skupine za nukleofilni napad ili u direktnu katalizu.¹⁹ Dugo se smatralo da je ribosom prevelika molekula za strukturne analize. Iako je 1980. godine dobiven stabilni kristal 50S podjedinice, tek 2000. godine je objavljena prva kristalna struktura.²⁰ Rezolucija od 2,4Å je omogućila da se lociraju molekule vode, metalni ioni i eventualne promjene baza, te je značila veliki uspjeh u dokazivanju da samo molekula RNA ima katalitičku aktivnost u sintezi proteina.^{21,22} Kristalna struktura velikepodjedinice ribosoma je otkrila da nijedan proteinski dio ne postoji bliže od 18 Å od mjesta stvaranja peptidne veze i tako isključila moguću ulogu proteina u ovoj reakciji. Dakle, proteinska komponenta ne sudjeluje u reakciji peptidil-transfera i zbog toga su ribosomi RNA enzimi, ribozimi.²⁰



Slika 15. Peptidil-transferazno mjesto P. Slika preuzeta iz A. Korostelev *et al.*, *Cell* **126** (2006) 1065-1077.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. R. M. Jimenez, J. A. Polanco, A. Lupták, *Trends Biochem. Sci.***40**(2015) 648-661.
2. N. K. Tanner, *FEMS Microbiol. Rev.***23** (1990) 257-275.
3. A. R. Ferre'-D'Amare', W. G. Scott, *Banbury Rep.***2** (2010) 1-10.
4. D. M.J. Lilley, *Trends Biochem. Sci.***28** (2003) 495-501.
5. M. J. Fedor, J. R. Williamson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6** (2005) 399-412.
6. N. B. Suslov, S. DasGupta, H. Huang, J. R. Fuller, D. M. J. Lilley, P. A. Rice, J. A. Piccirilli, *Nat. Chem. Biol.***11** (2015) 840-846.
7. G. Hausner, M. Hafez, D. R. Edgell, *Mobile DNA***8** (2014) 1-12.
8. R. Saldanha, G. Mohr, M. Belfort, A. M. Lambowitz, *FASEB J.* **7** (1993) 15-24.
9. M. R. Stahley, S. A. Strobel, *Science***309** (2005) 1587-1590.
10. F. Guo, A. R. Gooding, T. R. Cech, *Molecular Cell***16**(2004) 351-362.
11. T. R. Cech, *Annu. Rev. Biochem.***59** (1990) 543-568.
12. A. M. Lambowitz, S. Zimmerly, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.***3** (2010) 1-19.
13. R. T. Chan, A. R. Robart, K.R. Rajashankar, A. M. Pyle, N. Toor, *Nat. Struct. Mol. Biol.***19** (2012) 555- 557.
14. K. S. Keating, N. Toor, P. S. Perlman, A. M. Pyle, *RNA***16** (2010) 1-9.
15. M. Felletti, J. S. Hartig, *RNA***8** (2016) 1-21.
16. A. Torres-Larios, K. K. Swinger, T. Pan, A. Mondrago, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16** (2006) 327-335.
17. N. J. Reiter, A. Osterman, A. Torres-Larios, T. Pan, A. Monragón, *Nature***468**(2010)784-789.
18. T. Persson, S. Cuzic, R. K. Hartmann, *J. Biol. Chem.***278** (2003) 43394- 43401.
19. Q. Wu, L. Huang, Y. Zhang, *Sci. China. Ser. C: Life Sci.***52** (2009) 232-244.
20. A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg, H. F. Noller, *Cell* **126** (2006) 1065-1077.
21. M. M. Yusupov, *Science***292** (2001) 883-896.
22. V. Ramakrishnan, *Cell***108** (2002) 557-572.