

# Uloga C-terminalne domene RNA-polimeraze

---

Dunder, Snježana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:217:016006>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Snježana Dunder**

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

## **ULOGA C-TERMINALNE DOMENE RNA-POLIMERAZE**

### **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

26. kolovoza 2016.

Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:

2. rujna 2016.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

## Sadržaj

<b>§ Sažetak .....</b>	<b>iv</b>
<b>§ 1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. Prikaz odabrane teme .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Struktura C-terminalne domene RNA-polimeraze .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Očuvanost aminokiselinskih ostataka u kanonskoj heptadi .....	3
2.1.2. Strukturna raznolikost.....	4
<b>2.2. Funkcije CTD kôda.....</b>	<b>6</b>
2.2.1. CTD kinaze.....	6
2.2.2. CTD fosfataze .....	8
2.2.3. CTD u inicijacijskoj fazi transkripcije .....	8
2.2.4. CTD u elongacijskoj fazi transkripcije.....	9
2.2.5. Nastajanje mRNA kape .....	10
2.2.6. Uloga CTD u prekrajanju primarnog transkripta .....	12
2.2.7. Uloga CTD u nastajanju 3'-kraja .....	13
2.2.8. Terminacija.....	14
<b>2.3. Zaključak .....</b>	<b>15</b>
<b>§ 3. Literaturna vrela .....</b>	<b>16</b>

## § Sažetak

RNA-polimeraza II je enzim koji katalizira nastajanje mRNA. Razlikuje se od ostalih eukariotskih RNA-polimeraza jer u svojoj strukturi sadrži posebnu C-terminalnu domenu (CTD) koja sudjeluje u regulaciji aktivnosti ovoga enzima.

C-terminalna domena sadrži ponavljajući slijed od sedam aminokiselina YSPTSPS, a koliko puta će doći do ponavljanja i supstitucija aminokiselina u originalnom slijedu nekim drugim aminokiselinama, ovisi o složenosti organizma.

CTD je dinamična, neuređena struktura, sposobna zauzeti različite konformacije uslijed interakcije njenih aminokiselinskih ostataka s okolinom. Stabilizira se vodikovim vezama, van der Waalsovima i elektrostatskim interakcijama, te zauzimanjem najpovoljnije konformacije ovisno od okoline u kojoj se nalazi.

Njene funkcije određene su fosforilacijom i defosforilacijom aminokiselina koje se nalaze u ponavljajućem slijedu, a te procese kataliziraju razne kinaze i fosfataze.

Ima važnu ulogu u inicijaciji transkripcije jer veže razne proteine, transkripcijske faktore i pomaže u nastajanju preinicijacijskog kompleksa. Tijekom inicijacije se fosforilira kako bi RNA-polimeraza mogla ući u elongacijsku fazu transkripcije. Tijekom i nakon transkripcije dolazi do prekrajanja, procesiranja i nastajanja 5'- kape na primarnim transkriptima. CTD i ovdje ima važnu ulogu, interagirajući i vežući se na važne faktore koji sudjeluju u tim procesima.

U ovom radu će, stoga, biti fokus na tome koja je točno uloga CTD u navedenim procesima i na koji način C-terminalna domena sudjeluje u regulaciji aktivnosti RNA-polimeraze II.

## § 1. Uvod

Transkripcija je prvi korak ekspresije gena. Određeni segment DNA se kopira u RNA uz pomoć enzima RNA-polimeraze. Transkripcija se odvija na način da se DNA sekvencija čita uz pomoć enzima RNA-polimeraze pri čemu nastaje primarni transkript.

Kod eukariota transkripcija je složenija nego kod prokariota i odvija se u jezgri, a translacija u citoplazmi stanice. Dok kod prokariota postoji samo jedna RNA-polimeraza, kod eukariota postoje tri. RNA-polimeraza I katalizira nastanje rRNA, RNA-polimeraza II katalizira nastajanje mRNA, dok RNA-polimeraza III katalizira nastajanje tRNA.<sup>5</sup>

Postoji nekoliko regija značajnih za početak transkripcije kod eukariota. Jedan od njih je TATA-slijed koji se obično nalazi uzvodno između položaja -30 i -100. Zatim je značajan inicijacijski element koji povećava aktivnost transkripcije i nalazi se između položaja -3 i -5. Nizvodni element srži promotora nalazi se, kako mu ime kaže, nizvodno i to na položajima +28 i +32. On je osobito značajan u odsustvu TATA-slijeda kada se nalazi u sprezi sa inicijacijskim elementom. Važnu ulogu u početku inicijacije imaju i transkripcijski faktori (TF). Tako će inicijacija započeti kada se TFIID veže na spomenutu TATA-sekvenciju koju prepoznaje protein TBP (engl. *TATA-box-binding-protein*), koji je dio transkripcijskog faktora TFIID, i time nastaje središte inicijacijskog kompleksa. Na to središte redom se vežu i ostali transkripcijski faktori; prvo TFIIA pa TFIIB, TFIIF, RNA-polimeraza II, TFIIIE i TFIIH. Time je nastao osnovni transkripcijski uređaj. Tijekom transkripcije dvostruka uzvojnica DNA se odmotava, RNA-polimeraza putuje duž lanca kalupa DNA u smjeru 3' prema 5' katalizirajući pri tome sintezu novoga lanca u smjeru 5' prema 3' dodavajući nove nukleotide na 3'-kraj rastućeg RNA lanca.<sup>5,7</sup>

Nakon što je transkripcija završena, započinje procesiranje primarnog transkripta i to na način da primarni transkript na 5'-kraju dobiva 5'-kapu, a na 3'-kraju poliadenilatni rep. 5'-kapa nastaje otpuštanjem fosfatne skupine na 5'-kraju. Preostali difosfat reagira sa  $\alpha$ -fosforovim atomom GTP-a te tako nastaje 5'-5' trifosfatna veza. Na 3'-kraju se primarni transkript cijepa endonukleazama nakon slijeda AAUAAA nakon čega poli(A)-polimeraza dodaje oko 250 adenilata na 3'-kraj.

RNA-polimeraza II je enzim koji se sastoji od 12 podjedinica; dvije velike (Rpb1 i Rpb2) i deset manjih. Rpb1 podjedinica veže DNA, Rpb2 podjedinica sadrži u svojoj strukturi lizinske i histidinske ostatke koji pomažu vezanju nukleotida, a obje doprinose aktivnom mjestu enzima. Strukturiraju se tako da nastaje šupljina u enzimu koja olakšava interakciju s DNA. Manje podjedinice su raspoređene oko ove dvije najveće. Površina RNA-polimeraze II je negativno nabijena isključujući područje aktivnog mjesta koje je pozitivno nabijeno. Najveća podjedinica, Rpb1, sadrži u svojoj strukturi posebnu C-terminalnu domenu koja ne sadrže prokariotske i preostale dvije eukariotske RNA-polimeraze.<sup>7</sup>

C-terminalna domena (CTD) sadrži slijed YSPTSPS koja se ponavlja više puta, a broj njenih ponavljanja ovisi o složenosti organizma i varira od 26 ponavljanja kod kvasca do 52 kod sisavaca. Činjenica da svaka aminokiselina u navedenom heptapeptidu može biti modificirana, dovela je do toga da je ta C-terminalna domena od esencijalne važnosti za život svih eukariotskih organizama. Razumijevanje tih modifikacija, njihovih funkcija i regulacija, važno je za razumijevanje mehanizama koji kontroliraju ekspresiju gena.<sup>3</sup>

## § 2. Prikaz odabrane teme

### 2.1. Struktura C-terminalne domene RNA-polimeraze

#### 2.1.1. Očuvanost aminokiselinskih ostataka u kanonskoj heptadi

C-terminalna domena RNA-polimeraze II (CTD) se sastoji od ponavljajućeg aminokiselinskog slijeda  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ . Koliko puta će se taj slijed ponoviti i koliko će biti očuvan, ovisi od organizma do organizma (Slika 1).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>
1. YSPTSPY	1. YSPSPN	1. YSPTSPN
2. YSPTSPN	2. YSPTSPN	2. YSPSPG
3. YSPTSPS	3. YASPN	3. YTPSPS
4. YSPTSPS	4. YSTTPN	4. YSPTSPS
5. YSPTSPS	5. YNPOSTG	5. YSPTSPS
6. YSPTSPS	6. YSPSSG	6. YSPTSPN
7. YSPTSPS	7. YSPTSPV	7. YSPTSPS
8. YSPTSPS	8. YSPTVDF	8. YSPTSPS
9. YSPTSPS	9. YSPSFA	9. YSPTSPS
10. YSPTSPS	10. YSPSNL	10. YSPTSPS
11. YSPTSPS	11. YSPGNA	11. YSPTSPS
12. YSPTSPS	12. YSPSSN	12. YSPTSPS
13. YSPTSPS	13. YSPNPS	13. YSPTSPS
14. YSPTSPS	14. YSPTSPS	14. YSPTSPS
15. YSPTSPS	15. YSPSSPS	15. YSPTSPS
16. YSPTSPS	16. YSPTSPC	16. YSPTSPS
17. YSPTSPN	17. YSPTSPS	17. YSPTSPS
18. YSPTSPS	18. YSPTSPN	18. YSPTSPS
19. YSPTSPS	19. YTPVTPS	19. YSPTSPS
20. YSPTSPS	20. YSPTSPN	20. YSPTSPS
21. YSPTSPS	21. YSPSPQ	21. YSPTSPS
22. YSPTSPN	22. YSPSPN	22. YSPTSPN
23. YSPTSPS	23. YSPGVK	23. YSPTSPN
24. YSPTSPG	24. YSPTSPT	24. YTPSPS
25. YSPSPN	25. YSPSSPS	25. YSPTSPS
26. YSPVDF	26. YGSPGSPQ	26. YSPTSPN
	27. YTPSPQ	27. YTPSPN
	28. YSPSPK	28. YSPTSPS
	29. YSPTSPN	29. YSPTSPS
	30. YSPSPQ	30. YSPTSPS
	31. YSPSNQ	31. YSPSPK
	32. YSPTGST	32. YTPSPFT
	33. YSPTSPN	33. YTPSPS
	34. YSPNNSI	34. YSPSSPS
	35. YSPSSTK	35. YSPSPK
	36. YSPTSPT	36. YTPSPS
	37. YTPVFN	37. YSPSPC
	38. YSPTSPN	38. YTPSPK
	39. YSPTSPS	39. YSPTSPK
	40. YSPTSPN	40. YSPTSPK
	41. YSPSSPT	41. YSPTSPT
		42. YSPTTPK
		43. YSPTSPT
		44. YSPTSPV
		45. YTPSPK
		46. YSPTSPT
		47. YSPTSPK
		48. YSPTSPT
		49. YSPTSPKST
		50. YSPTSPC
		51. YSPTSPT
		52. YSPTSPA

Slika 1. Očuvanost aminokiselinskih slijedova C-terminalne domene kod tri različita organizma; *Saccharomyces cerevisiae* – pekarski kvasac, *Drosophila melanogaster* – vinska muha, *Homo sapiens* - čovjek. Zelenom bojom označene su mutacije u sekvenciji. (Preuzeto iz <sup>1</sup>)



CTD RNA-polimeraze II iz kvasca je najočuvanija, gdje se samo 6 od 26 ukupnih ponavljanja razlikuje od navedenog slijeda, dok se kod čovjeka u 31 od 52 ponavljanja nalazi jedna ili više supstitucija.<sup>1,2</sup>

Da bi se ispitala važnost točno određenih aminokiselina u heptapeptidu vršena su istraživanja na pekarskom kvascu *Saccharomyces cerevisiae* koja su pokazala da će zamjena serina na položajima 2 i 5 glutamatom ili alaninom dovesti do gubitka vijabilnosti budući da su ta mjesta ključna za fosforilaciju. Isti ishod će nastupiti zamijeni li se tirozin na položaju 1 fenilalaninom što je dovelo do zaključka da je i taj položaj moguće mjesto fosforilacije. No, zamjena treonina na položaju 4 ili serina na položaju 7 neće imati značajan utjecaj na rast stanice. To nas dovodi do zaključka da nisu svi položaji jednako važni za ispravno funkcioniranje organizma i da su neki puno važniji od drugih. Ovakva istraživanja nisu intenzivno provedena na sisavcima.<sup>1</sup>

Također je važna i činjenica, do koje se došlo istraživanjima na kvascu, da je za vijabilnost stanica kvasca nužno barem 8 ponavljanja heptapeptidnog slijeda u C-terminalnoj domeni RNA-polimeraze II. Došlo se i do zaključka da su se mutirane stanice kvasca mogle oporaviti od delecija reduplikacijom, iako su imale mali broj ponavljajućih sljedova divljeg tipa CTD. Za funkciju CTD kôda nužna su barem dva ponavljanja. Što su sekvencije međusobno udaljenije (npr. umetanjem alanina između ponavljanja), to će se CTD slabije fosforilirati te se na taj način smanjuje vijabilnost.<sup>1,2</sup>

Činjenice su to koje su dovele do zaključka da su za ispravnu funkciju CTD potrebni, kako minimalan određeni broj ponavljanja sekvencije YSPTSPS, tako i određena duljina CTD kôda.<sup>1</sup>

### 2.1.2. Strukturna raznolikost

Promatra li se trodimenzionalna struktura aminokiselina koje čine CTD, uočavaju se regije sa glomaznim aminokiselinskim ostacima. Te glomazne, neuređene regije čine uglavnom hidrofobni, nabijeni i polarni ostaci. Unatoč toj neuređenosti, aminokiseline u sekvenciji se ipak slažu u sekundarne strukture na način da čine  $\beta$ -okrete. Nastajanje tih  $\beta$ -okreta je specifično za SPSY i SPTS motive.

Da bi se došlo do jasnije strukture i prostornog rasporeda aminokiselina u sekvenciji, provedene su analiza NMR-om te spektrometrom cirkularnog dikroizma (CD).

NMR-om su ispitivane sekvencije ponovljene više puta kao i samo jedna sekvencija. Rezultati su pokazali da je CTD neuređena i u otopini, ali u otopini su prisutni mali smotani fragmenti koji imaju sklonost stvaranja  $\beta$ -okreta. Doda li se u otopinu, koja sadržava CTD, otapalo koje ima sposobnost pravljenja vodikovih veza, povećat će se broj peptida koji poprimaju konformaciju  $\beta$ -okreta. Zaključak je da je CTD u otopini dinamična.

Ako imamo SPXX motiv (S-serin, P-prolin), i na položaj X iza prolina stavimo alanin ili glicin, NMR-om je pokazano da će se stabilizirati nastanak okreta. Dakle, što se češće pojavljuju navedene aminokiseline, to će se favorizirati nastajanje  $\beta$ -okreta koji će se pojavljivati u strukturi. Koristeći CD pokazano je da će zamjena Ser5 alaninom pogodovati pojavi poliprolinskih II uzvojnica u vodi, a gubitku  $\beta$ -okreta u trifluoroetanolu koji je otapalo s mogućnošću nastajanja više vodikovih veza.

Ograničavajuća okolnost, koja utječe na stupanj smatanja aminokiselina u polipeptidnoj sekvenciji, je činjenica da peptidna veza Pro-X može postojati u dvije konformacije – *cis* i *trans*. *Trans* konformacija se pojavljuje češće jer smanjuje sterička odbijanja prolina i aminokiseline s kojom je on povezan peptidnom vezom. Pretvorba *cis* i *trans* izomera jednog u drugi je spora i ograničava mogućnost smatanja CTD u kompaktniji oblik.

Stabilizacija same CTD se postiže stvaranjem vodikovih veza (intramolekulskih i intermolekulskih), elektrostatskim i van der Waalsovim interakcijama te navedenim steričkim ograničenjima.

Navedena neuređenost CTD dovodi do zaključka da CTD *in vivo* zauzima veliki volumen. Taj volumen još bi se dodatno povećao fosforilacijom jer se negativni naboji međusobno odbijaju. Povećanje volumena uslijed fosforilacije dovelo bi do toga da bi CTD zauzimala volumen veći i od same RNA-polimeraze. No vezanjem proteina za C-terminalnu domenu struktura se stabilizira, smanjuju se sterička odbijanja i CTD može poprimiti kompaktniju strukturu.<sup>2</sup>

## 2.2. Funkcije CTD kôda

Koncept CTD kôda proizašao je na temelju istraživanja koja su pokazala da su posttranslacijske modifikacije C-terminalne domene direktno povezane s određenim događajima u transkripciji. Te posttranslacijske modifikacije najvećim dijelom uključuju fosforilaciju i defosforilaciju određenih aminokiselina koje se nalaze u strukturi C-terminalne domene RNA-polimeraze.

CTD kôd, dakle, predstavljaju posttranslacijske modifikacije C-terminalne domene RNA-polimeraze i sposobnost regulatornih proteina da prepoznaju te modifikacije i određene konformacije CTD što za posljedicu ima činjenicu da je CTD značajan regulator tijekom transkripcije.<sup>1</sup>

### 2.2.1. CTD kinaze

Kinaze su enzimi koji kataliziraju prijenos fosforilne skupine s ATP-a na neki akceptor. Za ispravno funkcioniranje CTD nužna je fosforilacija aminokiselina u njenom specifičnom heptapeptidu te tu nastupaju razne CDK (ciklin ovisne kinaze, engl. *cyclin-dependent kinases*).<sup>2</sup>

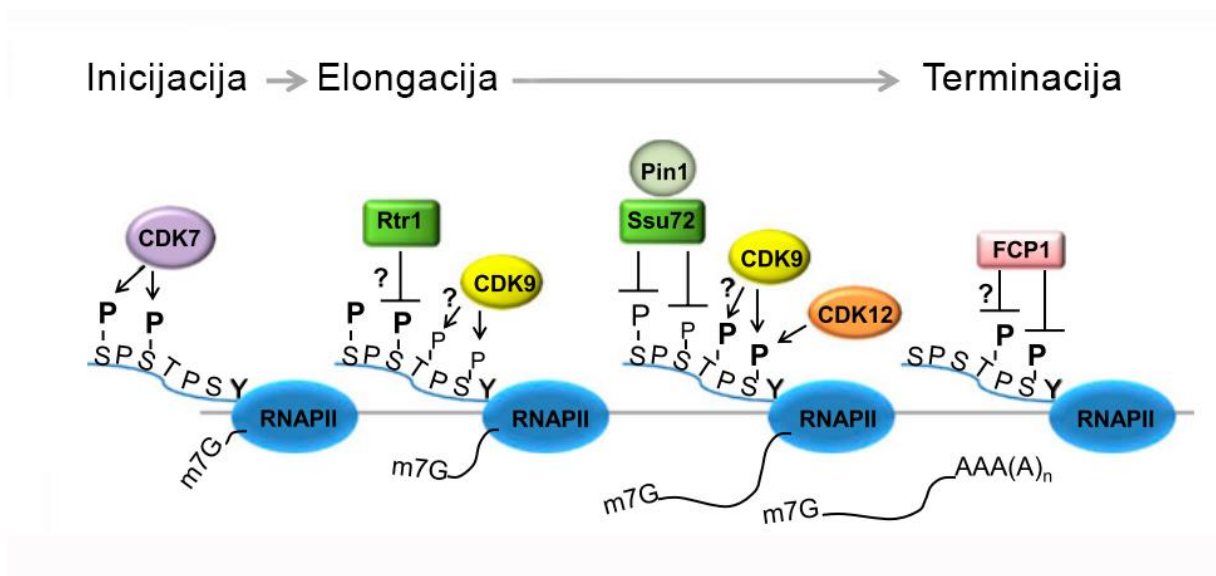
Fosforilacije serina na položajima 5 i 7 katalizira CDK7 (koji je sastavni dio transkripcijskog faktora TFIIH, o kojemu će više riječi biti u kasnijim poglavljima), a serin na položaju 5 fosforilira kinaza CDK9. CDK9 je također katalizator i za fosforilaciju treonina na položaju 4. Enzim P-TEFb kod sisavaca analogan je enzimu CDK9. Fosforilacija serina na položaju 5 nužna je u inicijaciji transkripcije, što znači da je aktivnost enzima CDK7 jedna od ključnih u početnim koracima transkripcijskog ciklusa. Mutacije koje dovode do smanjene aktivnosti kinaze Kin28 kod kvasca (analogna CDK7) imaju za rezultat odsustvo fosforilacije serina na položaju 5 što odgađa početak transkripcije.

CDK8, podjedinica kompleksa medijator, također može sudjelovati u fosforilaciji CTD, mada još uvijek nije poznato u kolikoj mjeri. Poznato je da CDK8 također djeluje i kao negativni transkripcijski regulator i to na način da utječe na transkripcijski faktor TFIIH smanjujući njegovu sposobnost da potiče inicijaciju transkripcije.

Tijekom elongacijske faze transkripcije, važno je djelovanje pozitivnog faktora elongacije transkripcije p-TEFb (sastoji se od CDK9 i ciklina T). Dakle, CDK9 ima važnu ulogu u prelasku iz inicijacijske u elongacijsku fazu transkripcije.

Dva elongacijska faktora (DSIF i NELF) vežu se na RNA-polimerazu II nizvodno od početnog transkripcijskog mjesta što dovodi do pauziranja transkripcije. Rješenje za ovaj problem iznjedrio je faktor p-TEFb na način da katalizira fosforilaciju NELF-a koji se u fosforiliranom obliku nakon toga otpušta sa RNA-polimeraze II i transkripcija se može nastaviti dalje.

Dvije kinaze kod pekarskog kvasca, Bur1 i Ctk1 analogne su kinazi CDK9 kod viših eukariota, a kinaza CTDK1 funkcioniše na sličan način kao p-TEFb; fosforilirajući CDT tijekom elongacije i na taj način potičući transkripciju. Bur1 i Ctk1 kinaze aktivne su također tijekom elongacije.<sup>3</sup>



Slika 2. Prikaz aktivnosti kinaza i fosfataza koje sudjeluju u fosforilaciji, odnosno defosforilaciji aminokiselinskih ostataka CTD RNA - polimeraze u pojedinim fazama transkripcije. (Preuzeto iz i prilagođeno prema <sup>3</sup>)

### 2.2.2. CTD fosfataze

Fosfataze su enzimi koji kataliziraju uklanjanje fosfatne skupine sa supstrata hidrolizirajući pri tome monoestere fosforne kiseline na fosfatni anion i molekulu sa slobodnom hidroksilnom skupinom.

Da bi se regulirao tijek i dinamika fosforilacije C-terminalne domene RNA-polimeraze II te da bi se RNA-polimeraza II pripremila za novi ciklus transkripcije, potrebno je defosforilirati određene aminokiselinske ostatke u specifičnom heptapeptidnom slijedu. To je zadaća enzima fosfataza i to dviju glavnih Fcp1 i Ssu72, te ostalih manjih CTD fosfataza.

Da bi se formirao preinicijacijski kompleks i normalno odvijala elongacija, nužna je fosfataza Fcp1, čija inaktivacija uzrokuje letalnost. Vezana je na 3'- i 5'-kraju aktivnih gena i zadužena je za defosforilaciju Ser5-P i Ser2-P iako se čini da favorizira potonji. Mutacije navedene fosfataze dovode do pojačane fosforilacije serina na položaju 2. Iako Fcp1 ima ulogu i ranije u transkripcijskom procesu, čini se da je odgovorna za defosforilaciju pri završetku transkripcije.

Drugi enzim koji je naveden je Ssu72 i, za razliku od Fcp1, on preferira položaj Ser5-P (iako sudjeluje i u defosforilaciji Ser7-P) te favorizira *cis*-konfiguraciju peptidne veze Ser5-Pro6. Veže se i na 3'-kraju gena i u blizini promotorskih mjesta iako ga se češće može naći na 3'-kraju. S obzirom da se fosfataza Ssu72 nalazi u blizini 3'-kraja gena, ako dođe do mutacije fosfataze Ssu72, fosfataza neće defosforilirati Ser5-P, te će doći do nagomilavanja Ser5-P u C-terminalnoj domeni RNA-polimeraze II koja transkribira 3'-kraj gena. Istraživanja na HeLa stanicama (prva ljudska linija besmrtnih stanica) pokazala su da je aktivnost Ssu72 nužna za procesiranje 3'-kraja transkripta, ali samo kada se procesiranje 3'-kraja događa dok transkripcija još uvijek nije gotova. Istraživanja na kvascu *in vitro* i *in vivo* su pokazala da kao fosfataza djeluje i regulator transkripcije 1 (Rtr1) na način da defosforilira Ser5-P. Mutacije u Rtr1 pokazale su da će se u tom slučaju na 5'-kraju nagomilavati Ser5-P na C-terminalnoj domeni RNA-polimeraze koja transkribira 5'-kraj gena.<sup>2,3</sup>

### 2.2.3. CTD u inicijacijskoj fazi transkripcije

Nastajanje osnovnog transkripcijskog uređaja nužno je za početak transkripcije. Sada će se razmotriti koja je uloga CTD u samoj inicijaciji transkripcije.

Da bi transkripcija započela, CTD mora biti defosforilirana. Takva defosforilirana CTD u stanici privlači i za sebe veže kompleks medijator koji služi za privlačenje transkripcijskih faktora na RNA-polimerazu II. Vežanje medijatora na CTD u inicijacijskoj fazi transkripcije nužno je za odvijanje transkripcije *in vivo*. Ispitivanja *in vitro* su, nasuprot tome, pokazala da CTD i kompleks medijator nisu toliko važni u nekim sustavima te da se transkripcija *in vitro* može odvijati i bez vezanja medijatora na CTD te će RNA-polimeraza, koja nema CTD, i dalje uspješno katalizirati transkripciju. Osim što je nužno da je CTD defosforilirana da bi na sebe vezala kompleks medijator, također je poznato da neće doći do nastajanja preinicijacijskog kompleksa ukoliko je CTD fosforilirana.<sup>2,4</sup>

Netom prije nastajanja prve fosfodieterske veze u transkripciji, na CTD djeluju kinaze i ona se brzo fosforilira na položajima Ser5 i Ser7. Ta fosforilacija je ključan događaj koji potiče disocijaciju kompleksa medijator te ostalih faktora, koji su sudjelovali u nastajanju preinicijacijskog kompleksa, sa RNA-polimeraze.<sup>4</sup>

#### 2.2.4. CTD u elongacijskoj fazi transkripcije

Nasuprot činjenici da je nužno za početak inicijacije da CTD bude defosforilirana, za ulazak u elongacijsku fazu transkripcije, CTD mora biti fosforilirana.

CTD je pri ulasku u fazu elongacije fosforilirana na položajima Ser5 i Ser7, a tijekom elongacije biva fosforilirana na još dva dodatna položaja, na Ser2 i Thr4. Kao što je napomenuto na kraju prethodnog poglavlja, važnost fosforilacije je u tome da ona omogućuje napredovanje transkripcije, fosforilirana CTD pogoduje disocijaciji kompleksa medijator čije je vežanje bilo nužno za početak transkripcije.<sup>2</sup>

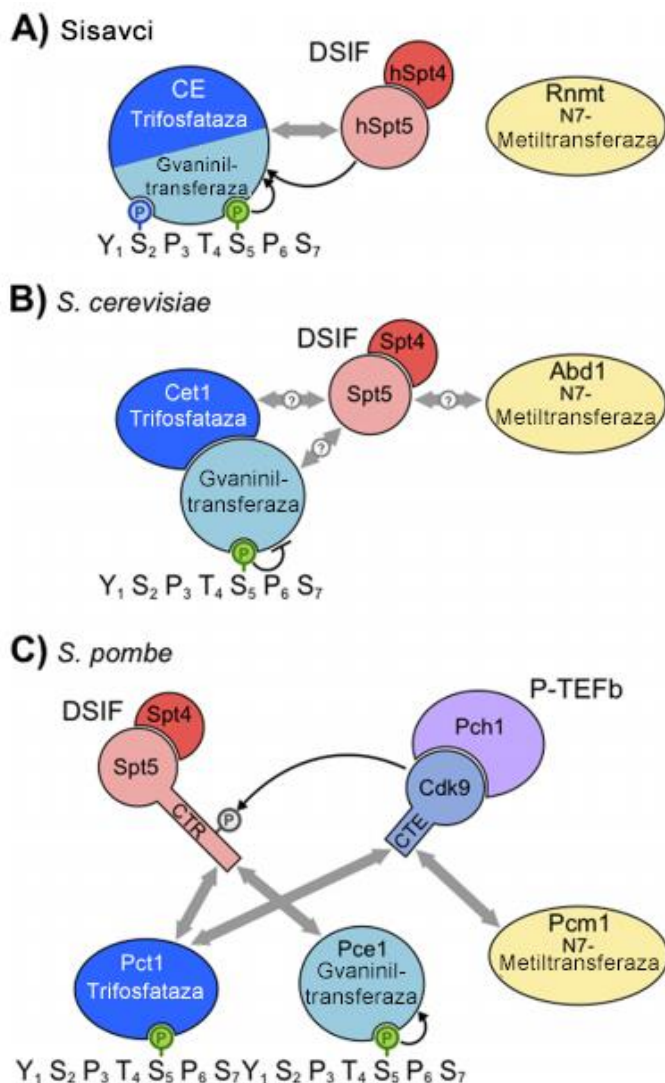
Analizom genoma kvasca došlo se do sljedećih rezultata: Tijekom transkripcije, netom nakon njenog početka, uočava se da će transkripciju katalizirati RNA-polimeraza u čijoj se C-terminalnoj domeni nalazi fosforilirani serin na položaju 5 i to najčešće dok je CTD u blizini mjesta početka transkripcije. Ser5-P se defosforilira kako transkripcija napreduje prema 3'-kraju. Suprotno od toga, napredovanjem transkripcije i uklanjanjem Ser5-P, dolazi do češćeg pojavljivanja Ser2-P, a do najvećeg broja fosforiliranih serina na položajima 2 u ponavljajućim slijedovima CTD dolazi oko 600 nukleotida nizvodno od početnog transkripcijskog mjesta,

ovisno, naravno i o duljini gena. Koliko će geni uistinu slijediti ovaj model, ovisi i o njihovoj duljini.<sup>3</sup>

#### 2.2.5. Nastajanje mRNA kape

Eukarioti, za razliku od prokariota, imaju tri RNA-polimeraze koje kataliziraju transkripciju i čiji su rezultat molekule RNA s različitim ulogama u stanici. No, samo produkti RNA-polimeraze II (mRNA) dobivaju kapu na 5'-kraju i to netom nakon sinteze. Znači li to da CTD RNA-polimeraze II ima ključnu ulogu u ovome procesu?

Nastajanje kape je modifikacija 5'-kraja primarnog transkripta RNA-polimeraze II. To je proces u više koraka koji se odvija na način da RNA-trifosfataza (RTaza) katalizira uklanjanje jedne fosfatne skupine s 5'-kraja primarnog transkripta. Zatim GTP-ovisna gvanililtransferaza (Gtaza) katalizira adiciju GTP-a na difosfatni kraj. Zadnji korak je dodavanje metilne skupine na položaj 7 gvanina koji se nalazi na 5'-kraju. Taj korak katalizira metiltransferaza. Taj kraj na kojem je nastala 5'-5' trifosfatna veza naziva se kapom.<sup>3,5</sup>



Slika 3. Regulacija enzima za nastajanje kape na 5'-kraju kod tri različita organizma. Podebljane sive strjelice označavaju fizičke interakcije, a tanke crne označavaju aktivaciju i represiju. (Preuzeto iz i prilagođeno prema <sup>4</sup>)

Uloga CTD u ovom procesu je privlačenje enzima koji su ključni za nastajanje *kape*. Kod sisavaca (Slika 3A) trifosfataza i gvanililtransferaza dio su jednoga proteina (CE). Nužna je interakcija gvanililtransferaze sa fosforiliranim serinima na položajima 2 i 5 u sekvenciji C-terminalne domene. Fosforilirani serin na položaju 5, stimulira aktivnost gvanililtransferaze, zajedno s hSpt5, podjedinicom elongacijskog faktora DSIF.

Kod pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) (Slika 3B) trifosfataza je dio proteina Cet1, a gvanililtransferaza proteina Ceg1. Uočava se da sa CTD interagira samo gvanililtrasferaza, i to vežući se na fosforilirani serin na položaju 5 u heptapeptidu. Za



privlačenje proteina Cet1 nije nužna sama CTD, ali postoje indikacije da u privlačenju Cet1, pored ostalih mehanizama, ima ulogu i interakcija CTD s proteinom Ceg1.

Trifosfataza i gvanililtransferaza kod kvasca *Schizosaccharomyces pombe* nalaze se na zasebnim proteinima (Pct1 te Pce1) koji međusobno ne dolaze u interakciju, ali je svaki povezan s fosforiliranim serinom na položaju 5 (Slika 3C).<sup>4</sup>

#### 2.2.6. Uloga CTD u prekrajanju primarnog transkripta

Novonastali primarni transkript sastoji se od eksona i introna. Da bi nastala zrela i funkcionalna mRNA, introne je potrebno izrezati. Eksoni ostali nakon izrezivanja introna moraju se međusobno povezati. Taj proces naziva se prekrajanjem. Prekrajanje može započeti i prije terminacije transkripcije. Potrebno je odrediti gdje će se točno dogoditi prekrajanje.

U eukariotskim stanicama intron počinje s GU, a završava s AG. Također je poznato da na 5'-kraju introna postoji slijed AGGUAAGU. GU je stalan u toj sekvenciji. Na 3'-kraju introna nalazi se slijed od 10 pirimidinskih baza, iza tog slijeda neka druga baza pa zatim citozin. Iza citozina nalazi se AG koji označava završetak introna.

Male nuklearne RNA (snRNA) kataliziraju prekrajanje i nalaze se u kompleksu za prekrajanje (engl. *spliceosome*). Te snRNA dobile su ime U1, U2, U3... U kompleksu za prekrajanje također se nalaze i mnogi proteini koji se nazivaju faktori prekrajanja. Male nuklearne RNA se međusobno vežu s proteinima u strukture koje se nazivaju male jezgrine ribonukleoproteinske čestice (snRNP).

Prekrajanje su zapravo dvije transesterifikacijske reakcije, a odvija se na način da se kida veza između 5'-kraja introna i uzvodnog eksona što rezultira nastajanjem nove veze između fosfata na 5'-kraju introna i ostatka A. U drugoj reakciji transesterifikacije događa se napad 3'-OH skupine, na kraju prvog eksona, na fosfodiestersku vezu između tog istog introna i nizvodnog eksona koji se nalazi na drugom kraju introna.

Alternativno prekrajanje je regulirani proces tijekom ekspresije gena koji doprinosi tome da jedan gen kodira za više proteina. Načini na koje se primarni transkript može prekrojiti su različiti, pa se tako ekson može zadržati ili izrezati iz primarnog transkripta, intron se također može zadržati ili izrezati, a mogu se mijenjati i položaji 5'- i 3'-mjesto prekrajanja čime nastaju

duži, odnosno kraći eksoni. Ovim procesima moguće je tijekom ekspresije jednog gena proizvesti skup različitih, ali srodnih, proteina.<sup>5</sup>

Istraživanja u *in vitro* uvjetima pokazala su da će se prekranje i dalje odvijati i u odsustvu RNA-polimeraze II, ali da će biti sporije i neučinkovitije. Ako se u *in vitro* reakciju doda fosforilirana CTD (sama ili zajedno s RNA-polimerazom), potiče se prekranje.

Postoje dokazi da CTD ima ulogu i u alternativnom prekranju. Ako CTD veže protein SRp20 bogat serinom i argininom dolazi do inhibicije uključenja alternativnog eksona u gen za fibronektin. Mehanizam te inhibicije još uvijek nije poznat.<sup>2</sup>

Točna uloga CTD u prekranju i mehanizmi djelovanja još uvijek su predmetom istraživanja.<sup>3,4</sup>

#### 2.2.7. Uloga CTD u nastajanju 3'-kraja

Nastajanje 3'-kraja još je jedan od koraka potreban da se od primarnog transkripta dođe do zrele mRNA. Činjenica da transkript nakon završetka transkripcije nema poliadenilatni rep na 3'-kraju dovela je do zaključka da je poliadenilacija jedna od modifikacija primarnog transkripta, a odvija se u dva koraka. Prvo endonukleaze prepoznaju slijed AAUAAA, iza kojega cijepaju primarni transkript. Nakon cijepanja endonukleazama, dodaje se slijed od oko 250 adenilata uz poli(A)-polimerazu kao enzim. Poliadenilacija se odvija kotranskripcijski.<sup>5</sup>

CTD je važna u ovom procesu jer, kao i u većini do sad opisanih procesa u ovom radu, veže i dolazi u interakciju s faktorima koji sudjeluju u nastajanju 3'-kraja. Bitno je da je fosforilirana na položaju Ser2. Takva CTD povećava aktivnost poliadenilacijskog faktora Pcf11 kod stanica kvasca. Više razine Ser2-P ne znače i češće pojavljivanje Pcf11. Pcf11 se najčešće pojavljuje nizvodno od poliadenilacijskog mjesta. To se objašnjava na način da je CTD „zamaskirana“ tijekom transkripcije unutar transkripcijske regije, tako da je interakcija CTD s Pcf11 moguća tek kasnije.<sup>4</sup>

RNA-polimeraza II sudjeluje u biosintezi i drugih molekula RNA, kao što su razne male RNA koje ne dobivaju poliadenilacijski rep nakon transkripcije nego bivaju modificirane na neki drugačiji način. Takva RNA je, primjerice, snRNA. U tom slučaju CTD je važna u povezivanju transkripcije i posttranskripcijske modifikacije 3'-kraja transkripta.<sup>1,5</sup>

### 2.2.8. Terminacija

Terminacija transkripcije usko je povezana s modifikacijom 3'-kraja, a ovisi i o tipu transkripta.

Postoje dva modela koji objašnjavaju terminaciju. To su alosterički i torpedo model. Alosterički model terminaciju objašnjava tako da pretpostavlja da tijekom elongacije dolazi do destabilizacije cjelokupnog elongacijskog procesa uslijed vezanja faktora na CTD i njihova otpuštanja. Torpedo model terminaciju objašnjava djelovanjem RNA-egzonukleaze na novonastali 5'-kraj transkripta. RNA-egzonukleaza kod kvasca je Rat1, a kod čovjeka Xrn2. Pravi mehanizam terminacije negdje je između ova dva predložena modela.<sup>4</sup>

CTD privlači i veže već spomenute egzonukleaze čime direktno sudjeluje u terminaciji. Povezanost poliadenilacije i terminacije očituje se i u činjenici da je za vezanje Rat1 kod kvasca nužno i vezanje poliadenilacijskog faktora Pcf11 (Poglavlje 2.2.7.) što znači da će češće pojavljivanje Pcf11 imati za posljedicu i češće pojavljivanje Rat1. Za vezanje Rat1 na CTD u ovoj fazi, serin na položaju 2 mora biti fosforiliran (Slika 2).<sup>2,4</sup>

Kao što se vidi, za odvijanje svih faza transkripcije i posttranskripcijskih modifikacija, nužna je prisutnost i dinamika C-terminalne domene RNA-polimeraze.

### 2.3. Zaključak

U ovom radu opisano je na koji način C-terminalna domena (CTD) RNA-polimeraze II utječe na funkciju samog enzima RNA-polimeraze II.

Aktivnost C-terminalne domene RNA-polimeraze II određena je fosforilacijom i defosforilacijom aminokiselina u njenom ponavljajućem slijedu. Nužna je, kako za inicijacijsku, tako i za elongacijsku fazu transkripcije. Ima ulogu i u terminaciji transkripcije, ali to područje je još uvijek predmetom istraživanja. CTD privlači inicijacijske faktore te druge proteine koji sudjeluju u regulaciji transkripcije.

Osim u transkripciji, CTD ima značajnu ulogu i u procesiranju primarnog transkripta pa tako sudjeluje u nastajanju kape na 5'-kraju, poliadenilaciji na 3'-kraju te prekrajanju. To su procesi koji se u eukariotskoj stanici najčešće događaju kotranskripcijski.

CTD je važan dio enzima RNA-polimeraze II, koji zauzima važnu ulogu u procesu prepisivanja genetičke informacije kod eukariotskih organizama.

### § 3. Literaturna vrela

1. O. Jasnovidova, R. Stefl, The CTD code of RNA polymerase II: a structural view, *WIREs RNA*, **4** (2013) 1-16.
2. J. L. Corden, RNA-poymerase II C-Teriminal domain: Tethering Transcription to Transcript and Template, *Chem. Rev.*, **113** (2013) 8423–8455.
3. J.-P. Hsin, J. L. Manley, The RNA-polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing, *Genes Dev.*, **26** (2012) 2119-2137.
4. C. Jeronimo, A. R. Bataille, F. Robert, The Writers, Readers and Functions of the RNA Polymerase II C-Terminal Domain Code, *Chem. Rev.*, **113** (2013) 8491–8522.
5. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Vol. 1, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 821-850.
6. D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry life at molecular level*, Vol. 4, John Wiley & Sons, 2013., str. 931-935.
7. <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/genes-and-proteins-15/eukaryotic-transcription-108/elongation-and-termination-in-eukaryotes-446-11671/> (preuzeto 3. kolovoza 2016. god.)