

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

STRUKTURA I DINAMIKA
KOMPLEKSA ZA PREKRAJANJE RNA

THE STRUCTURE AND DYNAMICS
OF THE SPLICEOSOME

SEMINARSKI RAD

Anamaria Elek

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of molecular biology)

Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
1.1 Sastav kompleksa za prekrajanje RNA	3
1.2 Pre-mRNA supstrat kompleksa za prekrajanje RNA	4
1.3 Ciklus kompleksa za prekrajanje RNA	4
1.4 Konstitutivno i alternativno prekrajanje	7
2. PREPOZNAVANJE MJESTA PREKRAJANJA	9
2.1 Prepoznavanje očuvanih sljedova pre-mRNA.....	9
2.2 Definiranje preko introna ili eksona	11
2.3 Cis-djelujući elementi i trans-djelujući faktori	12
3. SASTAVLJANJE KOMPLEKSA	13
3.1 Proteini kataliziraju sastavljanje kompleksa.....	13
3.2 U4/U6.U5 tri-snRNP	14
3.3 Formiranje katalitičkog centra	18
4. AKTIVACIJA	19
4.1 Nove RNA interakcije	19
4.2 Proteini aktiviraju kompleks za prekrajanje	19
4.3 Novi proteini se asociraju s kompleksom tijekom aktivacije	23
5. KATALIZA	24
5.1 Dvije konformacije aktivnog mjesta.....	24
5.2 Katalitička uloga RNA	25
5.3 RNA-RNA interakcije	26
5.4 Struktura katalitičkog centra.....	28
5.5 Uloga proteina u katalizi.....	28
5.6 Usporedba sa samoizrezujućim intronima.....	31
6. RASTAVLJANJE KOMPLEKSA	32
7. REGULACIJA	33
7.1 Posttranslacijske modifikacije	33
7.2 Kinetički model provjere točnosti	35
7.3 Koordinacija s transkripcijom	35
8. ZAKLJUČAK	37
9. LITERATURA	38
10. SAŽETAK	42
11. SUMMARY	43

1. UVOD

Velika većina eukariotskih gena uz eksone, dijelove koji kodiraju za konačan genski produkt, sadrži i brojne nekodirajuće sljedove koji dolaze unutar gena (intragenski) i stoga su nazvani intronima. Do ovog značajnog otkrića 1977. godine su istovremeno i neovisno došli znanstvenici u dva laboratorija^{1,2}. Iako je utvrđeno da na eksone zapravo otpada tek manji dio od ukupne DNA, jer su introni čak 10 do 100 puta dulji, funkcija ovih naizgled nepotrebnih, dugačkih sljedova DNA nije bila definirana i jedno vrijeme su smatrani genetičkim smećem (eng. *junk DNA*), prije nego je u konačnici ustanovljeno da imaju važne uloge u regulaciji ekspresije gena. Eukariotski geni se procesom transkripcije u cijelosti prepisuju u primarne transkripte mRNA (pre-mRNA) koje se potom dorađuju, a precizno izrezivanje introna jedna je od najznačajnijih posttranskripcijskih modifikacija³. Introni se iz nekih molekula RNA sami izrezuju autokatalitičkom aktivnošću – takvi su primjerice introni mitohondrijskih i kloroplastnih gena. S druge strane, introni iz većine jezgrenih primarnih mRNA transkripata izrezuju se djelovanjem makromolekulskog ribonukleoproteinskog kompleksa za prekrajanje (eng. *spliceosom*). To je najbrojnija skupina introna i, za razliku od prve dvije koje su pronađene i kod bakterija, ovakvi introni karakteristika su isključivo eukariotskih transkriptoma. Uz tri već navedene, postoji i četvrta skupina introna za čije je izrezivanje potrebno djelovanje enzima endonukleaze. Takvi introni dolaze u nekim primarnim transkriptima tRNA.

Kao što je rečeno, za izrezivanje najvećeg broja introna potreban je funkcionalan kompleks za prekrajanje molekula RNA. Ovaj makromolekulski kompleks, mase preko 3 MDa⁴, katalizira precizno izrezivanje nekodirajućeg segmenta RNA i spajanje dvaju zaostalih slobodnih krajeva kodirajućih dijelova mRNA u produkt s kojeg se onda mogu translirati proteini. Jasno je odmah kako kompleks za prekrajanje mora biti izuzetno precizan, jer pogrešno izrezivanje tek jednog nukleotida rezultira pomakom okvira čitanja i vrlo vjerojatno potpunim gubitkom funkcije genskog produkta. Osim toga, kompleks mora biti dovoljno dinamičan i fleksibilan da može uspješno izrezivati introne koji dolaze u sklopu različitih sljedova s ograničenim brojem očuvanih elemenata prepoznavanja, a istovremeno i dovoljno specifičan da isključi brojne sljedove koji se mogu vezati u njegovo aktivno mjesto, a samo su nalik ispravnom supstratu. Kako bi zadovoljio sve ove zahtjeve, kompleks za prekrajanje sastavlja se iz ogromnog broja komponenti koje se koordinirano vežu i disociraju tijekom pojedinih reakcijskih koraka koji su pak svi, od sastavljanja kompleksa i vezanja supstrata, preko same katalize do rastavljanja kompleksa, regulirani na više razina^{4,5}.

1.1 Sastav kompleksa za prekrajanje RNA

U sastav kompleksa za prekrajanje ulazi pet evolucijski dobro očuvanih malih jezgrenih RNA molekula bogatih uridinom – U1, U2, U4, U5 i U6 snRNA (eng. *uridine-rich small nuclear ribonucleic acid*). Svaka snRNA specifično veže sedam Sm ili LSm (*Sm-like*) proteina i druge specifične proteine s kojima tvori ribonukleoproteinski kompleks, snRNP (eng. *small nuclear ribonucleoprotein*). Uz više od 50 proteina koji su dio snRNP-ova, u prekrajanju introna u ljudskim stanicama sudjeluje i preko 100 ne-snRNP proteinskih faktora koji nisu stalno vezani na kompleks, već se po potrebi s njim u određenoj fazi asociraju i kasnije disociraju^{6,7}. Ovakvo koordinirano djelovanje ribonukleinskih kiselina i proteina nije neuobičajena pojava u biološkim sustavima – ribonukleoproteinski kompleksi sudjeluju u brojnim staničnim procesima, od biosinteze proteina na ribosomima, njihova daljnjeg usmjeravanja posredstvom SRP (eng. *signal recognition particle*) RNP-a, do dorade RNA molekula u kojima sudjeluju sno/scaRNP-ovi i RNP RNaza P⁸. Ipak, za razliku od ribosoma kod kojeg više od 50% molekulske mase otpada na RNA molekule, u kompleksu za prekrajanje one sudjeluju s manje od 10% mase, dok većinu čine brojni proteinski faktori⁹. Također, dok je ribosom relativno stabilan makromolekulski kompleks s unaprijed definiranim katalitički aktivnim mjestom, kompleks za prekrajanje izuzetno je dinamičan i sastavlja se postepeno na svom supstratu^{6,8}. Zbog jako velikog broja komponenti i složenih interakcija koje se među njima ostvaruju, sklapanje kompleksa za prekrajanje kinetički je izuzetno zahtjevan proces, a zadatak je donekle olakšan time što se dio proteina i RNA prethodno pakira u manje komplekse koji se onda povezuju u funkcionalan multi-megadaltonski ribonukleoproteinski kompleks za prekrajanje. Veličina, fleksibilnost i dinamična struktura glavni su razlozi zbog kojih sve do nedavno nije bilo moguće odrediti detaljnu strukturu kompleksa za prekrajanje, a po tom je pitanju izuzetno značajan faktor i velik udio neuređenih proteina. Pretpostavlja se da na neuređene regije otpada 44 % od ukupnih proteina u sastavu kompleksa za prekrajanje kod čovjeka¹⁰, a 47 % kod kvasca¹¹, dok je prosječna vrijednost za čitav proteom ovih organizama 21.6 %, odnosno 13 %. Intrinzično neuređene regije nemaju nativnu trodimenzionalnu strukturu, što im daje fleksibilnost i omogućava lakši prelazak između različitih konformacija, a proteini koji sadrže neuređene regije s drugim faktorima uspostavljaju slabije interakcije pa se stoga njihovo vezanje i disocijacija odvijaju brže. Ova svojstva zaslužna su za izuzetnu plastičnost kompleksa za prekrajanje. Proteini koji sudjeluju u prepoznavanju pre-mRNA i sastavljanju kompleksa u pravilu imaju neuređenije strukture nego oni koji su usko vezani uz katalizu¹⁰. Neuređene regije

su još važne i stoga jer su česta mjesta posttranslacijskih modifikacija bitnih za regulaciju reakcija prekrajanja.

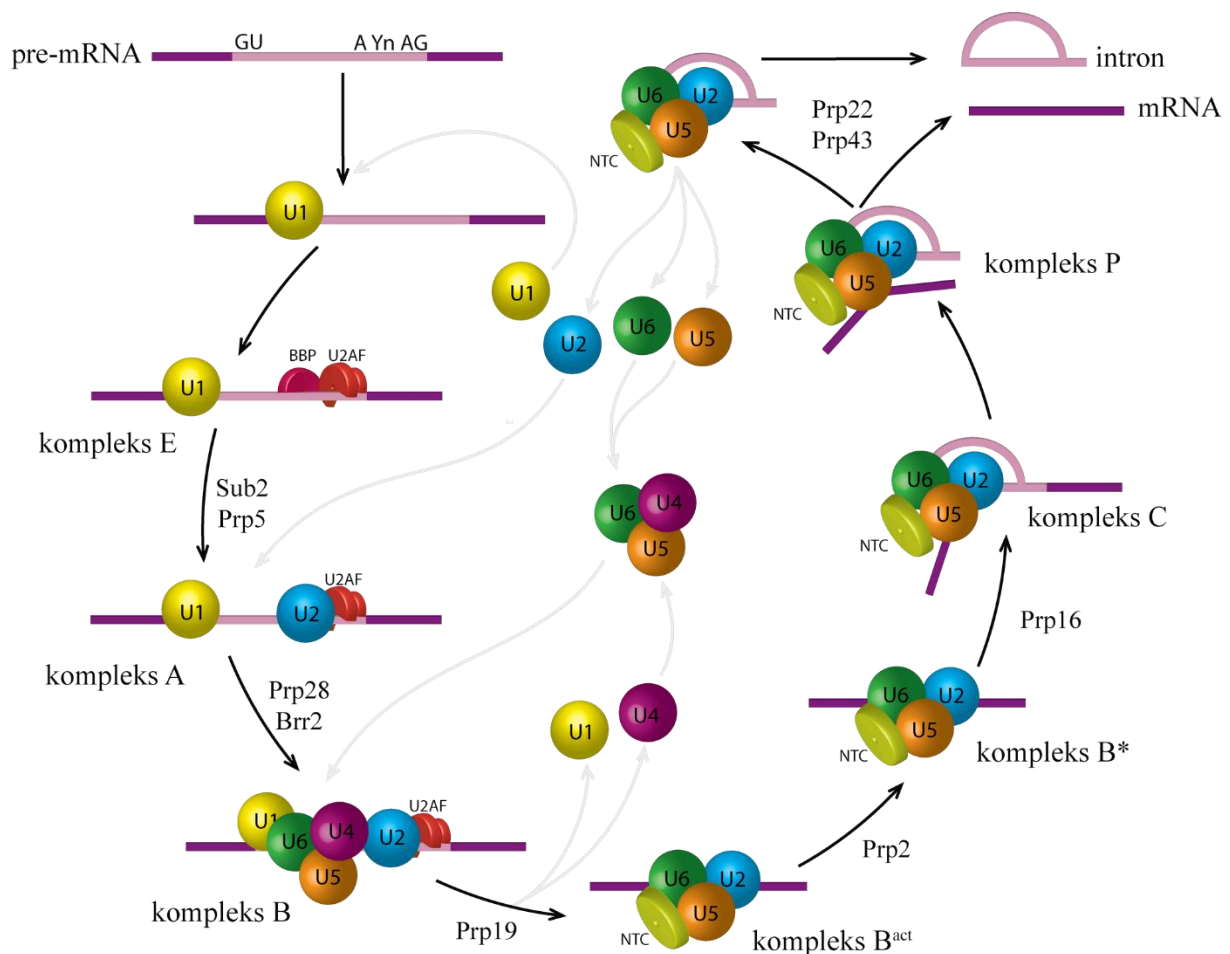
1.2 Pre-mRNA supstrat kompleksa za prekrajanje RNA

Sljedovi nukleotida koji definiraju granice između introna i eksona u primarnim genskim transkriptima slabo su očuvani, iako postoje specifična mjesta koja komponente kompleksa za prekrajanje mogu prepoznati. Većina introna na 5'-kraju (5' *splice site*, 5'-SS) sadrži očuvani dinukleotid GU, dok je na suprotnom 3'-kraju (3' *splice site*, 3'-SS) očuvan dinukleotid AG. Unutar introna je očuvan adenozin na položaju ~15-50 nukleotida uzvodno od 3'-SS, u sklopu mjesta grananja (eng. *branch-point sequence*, BPS). Kako je kod viših eukariota slijed koji sadrži mjesto grananja izuzetno degeneriran, da bi ga komponente kompleksa za prekrajanje mogle uspješno prepoznati, neposredno nizvodno dolazi 20-50 nukleotida dugačak polipirimidinski slijed (*polypyrimidine tract*, PPT). Dio introna ima očuvane dinukleotide AU i AC na 5'-kraju odnosno 3'-kraju – njih prepoznaje i izrezuje kompleks za prekrajanje u kojem je U1 zamijenjen s U11, a U2 s U12 snRNP-om te koji umjesto U4 i U6 sadrži U4atac i U6atac snRNP-ove⁸. Transkripti mRNA koji imaju ovakve introne relativno su rijetki i stoga manje proučavani, no pretpostavlja se da oba kompleksa za prekrajanje imaju dosta zajedničkih faktora prekrajanja, kao i da dijele osnovne reakcijske mehanizme.

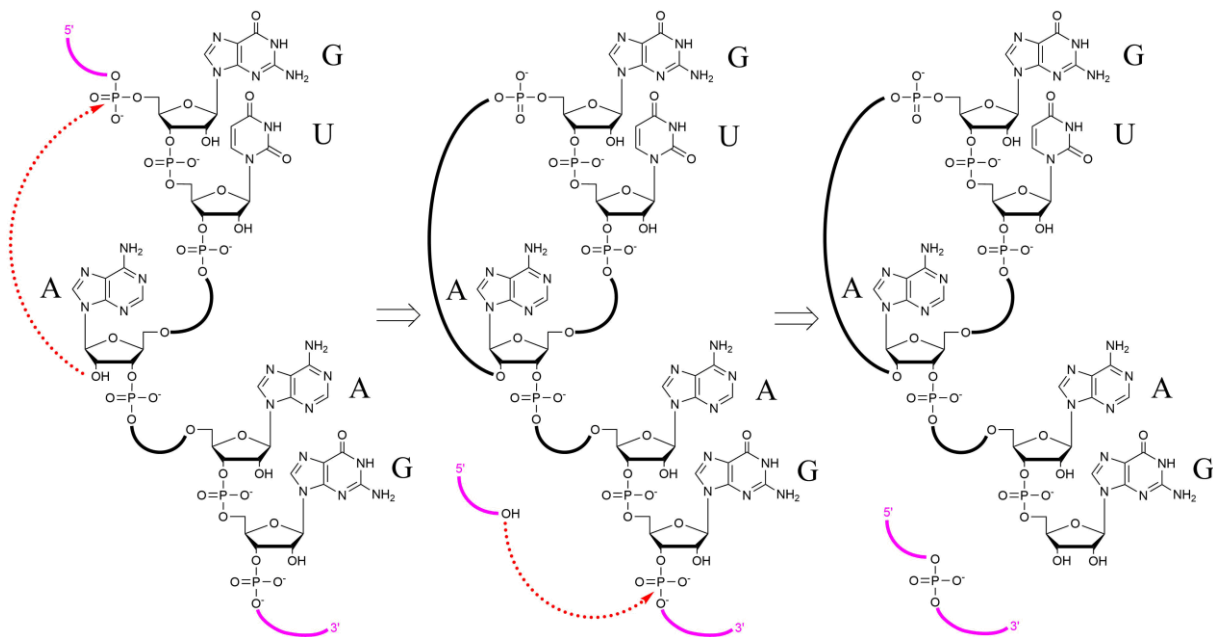
1.3 Ciklus kompleksa za prekrajanje RNA

Kompleks za prekrajanje RNA sastavlja se na molekuli mRNA koja je supstrat reakcije (Sl. 1). Klasični model sklapanja kompleksa je sekvencijski^{6,8}. Prema ovom modelu, najprije se U1 snRNP veže na 5'-SS, i to tako što U1 snRNA svojim 5'-krajem komplementarno prepoznaje slijed nukleotida, a proteini stabiliziraju uspostavljene interakcije. U prvom se koraku još vežu i proteini koji prepoznaju mjesto grananja i nizvodni polipirimidinski slijed te se tako formira prvi kompleks na mjestu prekrajanja, kompleks E (eng. *early complex*). U sljedećem koraku koji je, za razliku od prvog, ovisan o ATP-u, U2 snRNP veže se na mjesto grananja. Ponovno se snRNA sparuje s očuvanim slijedom nukleotida, a novi proteini vezanjem istiskuju dio otprije vezanih proteina, tako da promjene u sastavu i konformaciji do kojih dolazi stabiliziraju vezanje U2 snRNA s pre-mRNA. Na taj se način formira kompleks A (eng. *pre-spliceosome*). Kad se kompleksu priključe U4, U5 i U6 snRNP-ovi, unaprijed povezani u U4/U6.U5 tri-snRNP, nastaje kompleks B (eng. *pre-catalytic spliceosome*) koji, iako sadrži sve snRNP-ove, još uvijek nije katalitički aktivan. Na njega djeluju RNA helikaze Prp28 i Brr2 koje destabiliziraju vezane U1 i U4 snRNP-ove te oni disociraju. Nastali kompleks B^{act} u sljedećem

je koraku supstrat RNA-helikaze Prp2 te postaje katalitički aktivan kompleks za prekranje, B*. Ovaj kompleks katalizira prvi korak reakcije prekranja, u kojem OH skupina evolucijski očuvanog adenzina u mjestu grananja nukleofilno napada fosfatnu skupinu u 5'-SS te nastaje međuprodukt u obliku omče (Sl. 2). Kako bi se akomodirale novonastale strukture, u aktivnom mjestu dolazi do konformacijskih promjena i do formiranja kompleksa C koji katalizira drugi korak reakcije, nukleofilni napad slobodne OH skupine 5'-eksona na fosfatnu skupinu u 3'-SS (Sl. 2). S post-katalitičkog kompleksa P otpuštaju se spojeni eksoni, a intron, izrezan u obliku omče, ostaje vezan na kompleks ILS. U konačnici i intron disocira, a komponente kompleksa za prekranje se recikliraju.



Slika 1. Ciklus kompleksa za prekranje RNA. Kompleks za prekranje sastavlja se na pre-mRNA supstratu (E, A, B), aktivira se (B^{act}), katalizira dvostupanjsku reakciju izrezivanja introna (B*) i spajanja eksona (C), a postkatalitički kompleks (P) na kraju se rastavlja. Komponente kompleksa se recikliraju. Prikazani su sljedovi introna (svijetlo ljubičasto) i eksona (tamno ljubičasto) u pre-mRNA, s označenim očuvanim dinukleotidima GU na 5', odnosno AG na 3'-kraju, polipirimidinskim slijedom (Yn, n=20-50) i adeninom (A) u mjestu grananja. Prikazani su i svi snRNP-ovi te dio ne-snRNP faktora (BBP, U2AF, NTC), a na strelicama su navedene DEXD/H helicaze koje kataliziraju ključne reakcije u ciklusu. Detaljnije u tekstu.



Slika 2. Katalitičke reakcije prekrajanja. U prvoj transesterifikacijskoj reakciji 2'-OH skupina riboze isturenog adenozina u mjestu grananja nukleofilno napada fosfat na granici introna i 5'-eksona, a u drugoj reakciji OH skupina 5'-eksona nukleofilno napada na fosfat na granici introna i 3' eksona. Eksoni se povezuju, a intron se izrezuje u obliku omčice. Eksoni su prikazani ljubičasto, intron s očuvanim nukleotidima crno, a isprekidane crvene strelice prikazuju nukleofilne napade.

Opisani ciklus sklapanja, katalitičke aktivnosti i disocijacije kompleksa za prekrajanje RNA rekonstruiran je kroz brojne eksperimente izvedene uglavnom *in vitro*⁸, no postoje naznake da se *in vivo* katalitički aktivan kompleks ne formira nužno na identičan način. Primjerice, pokazano je da se u staničnom ekstraktu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na pre-mRNA u prvom koraku veže U1 snRNP koji dolazi u sklopu U1•U2•U4/U6•U5 penta-snRNP kompleksa. Dodatkom staničnog ekstrakta tretiranog nukleazama ovakav kompleks postaje katalitički aktivan¹². Nadalje, nedavno je objavljena struktura tri-snRNP-a iz kvasca *S. cerevisiae* koji ima vezanu pre-mRNA, na osnovi čega je sugerirano da i takav kompleks može sa pre-mRNA i U2 snRNP-om tvoriti katalitički aktivan kompleks za prekrajanje, neovisno o prepoznavanju introna od strane U1 snRNP-a¹³. Također se zna da u stanicama kvasaca *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* dolazi do nakupljanja kompleksa C, što ukazuje na to da je *in vivo* limitirajući korak reakcije drugi katalitički korak i/ili otpuštanje spojenih eksona nakon katalize, za razliku od *in vitro* eksperimenata u kojima je redovito najsporiји korak sastavljanje kompleksa¹⁴. Pretpostavka je stoga da su kompleksi opisani u ciklusu zapravo samo najstabilniji intermedijeri različitih puteva kojima nastaje katalitički aktivan kompleks za prekrajanje.

1.4 Konstitutivno i alternativno prekrajanje

Efikasnost izrezivanja introna iz primarnih transkripata mRNA ovisi o afinitetu pojedinih veznih mjesta za komponente kompleksa za prekrajanje – sljedovi koji imaju velik afinitet biti će efikasnije prepoznati i konstitutivno će se prekrajati, što znači da će svi transkripti imati izrezan intron⁸. Konstitutivno prekrajanje jednostavniji je scenarij izrezivanja introna, uobičajen kod kvasaca, ali ne i kod viših eukariota, čije pre-mRNA često sadrže više uzastopnih 5'-SS i 3'-SS pa, ovisno o tome koja dva slijeda kompleks za prekrajanje prepozna, jedan primarni transkript može dati više različitih zrelih mRNA. Ova je pojava poznata kao alternativno prekrajanje. Eksperimentalno je i pokazano da se introni ne izrezuju istim redoslijedom kojim su sintetizirani, što je jasan indikator kompeticije među pojedinim sljedovima¹⁵. Na taj način različitim prekrajanjem prosječnog ljudskog gena koji sadrži osam eksona i sedam introna može nastati tri ili više različitih mRNA molekula¹⁶. Osim zbog različitog afiniteta pojedinih intronskih sljedova za komponente kompleksa za prekrajanje, do alternativnog prekrajanja dolazi i uslijed promjena brzine transkripcije jer period u kojem RNA-polimeraza II sintetizira svaki intron određuje minimalan vremenski interval unutar kojeg se na taj intron mogu regrutirati komponente kompleksa za prekrajanje^{15,16}. Kad se sinteza pre-mRNA odvija većom brzinom, više različitih sljedova istovremeno je u kompeticiji za vezanje faktora prekrajanja, a kad je transkripcija sporija, primjerice u eksperimentima u kojima su mutirani elongacijski faktori, ili kad struktura kromatina usporava napredovanje RNA-polimeraze, često je za vezanje dostupan samo jedan specifičan slijed. Model koji objašnjava ovisnost prepoznavanja mjesta prekrajanja o brzini transkripcije podrazumijeva da se pri optimalnoj brzini uspostavlja ravnoteža između alternativno prekojenih izoformi¹⁷. S druge strane, neki se introni uspješno izrezuju neovisno o promjenama brzine transkripcije. Još uvijek nije jasno određeno što razlikuje takva mjesta prekrajanja od onih koja su ovisna o brzini transkripcije – moguće je da ključnu ulogu ima struktura kromatina ili specifični sljedovi i sekundarna struktura RNA¹⁷. Stvaranje sekundarnih struktura u području 5'-SS ili 3'-SS onemogućava prekrajanje (*cis*), a poznato je i da na ovim mjestima može doći do vezanja malih molekula RNA koje s pre-mRNA tvore dvolančane strukture i također onemogućavaju prekrajanje (*trans*)¹⁶. Nasuprot tome, prepoznavanje mjesta prekrajanja pospješuju nukleosomi jer induciraju pauziranje RNA-polimeraze, a histonski šaperoni koji kataliziraju formiranje ili disocijaciju nukleosoma stoga reguliraju reakcije prekrajanja. Ovi šaperoni usto i izravno utječu na vezanje faktora prekrajanja. Epigenetičke modifikacije, prvenstveno modifikacije histona i metilacija DNA, također su povezane s alternativnim prekrajanjem¹⁷. Ubikvitinacija i metilacija

histona H2 utječe na vezanje različitih faktora prekrajanja, hiperacetilacija H3 i H4 povezana je s ubrzanjem transkripcije i preskakanjem eksona, a metilacija DNA je rjeđa u intronima koji se izrezuju, u odnosu na one koji su zadržani u zreloom transkriptu. Zanimljivo je da i histonske modifikacije u heterokromatinu, a ne samo u kodirajućim sljedovima, značajno utječu na alternativno prekrajanje¹⁷.

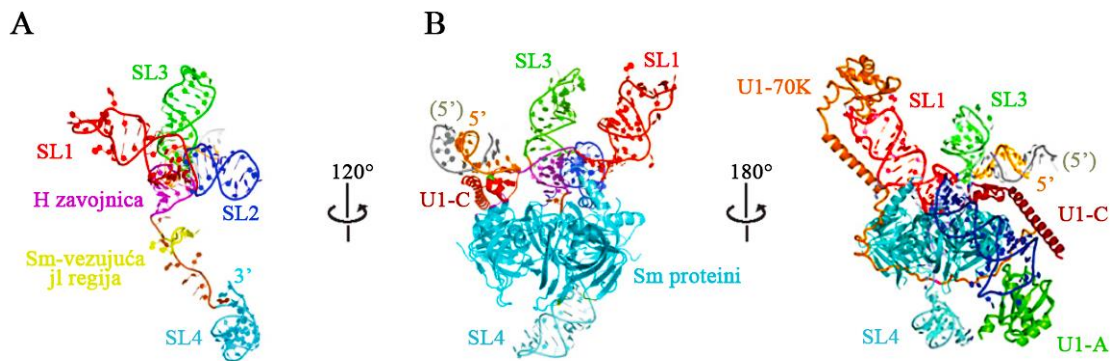
Sekvenciranjem genoma velikog broja organizama došlo se do iznenađujuće spoznaje da veličina genomske DNA nije u izravnoj korelaciji s fenotipskom kompleksnošću organizma, što se objašnjava alternativnim prekrajanjem, procesom koji ima ključnu ulogu u diverzifikaciji transkriptoma i proteoma složenijih organizama^{6,16}. U prilog ovom objašnjenju ide i činjenica da brojni proteini koji su identificirani u sastavu kompleksa za prekrajanje kod čovjeka i vinske mušice, a koji nemaju analoge kod kvasca, sudjeluju u alternativnom prekrajanju. Postoje stoga pretpostavke prema kojima se kod modelnog organizma *Caenorhabditis elegans* (oblič) alternativno prekraja 25% gena, kod vinske mušice 45%, a kod miša 63%, dok prema najnovijim analizama kod ljudi svi geni imaju barem dvije različite izoforme zrele mRNA nastale alternativnim prekrajanjem. Mutacije koje dovode do pogrešnog prekrajanja, a često su to tihe mutacije na granicama između introna i eksona ili u regulacijskim regijama RNA, genetičkim su istraživanjima kod ljudi povezane s pojavom bolesti. Neke su somatske mutacije u genima za faktore prekrajanja detektirane u tumorskim stanicama¹⁶⁻¹⁸.

2. PREPOZNAVANJE MJESTA PREKRAJANJA

2.1 Prepoznavanje očuvanih sljedova pre-mRNA

Ciklus kompleksa za prekrajanje počinje prepoznavanjem očuvanih dinukleotida u sklopu sljedova na 5'-kraju i 3'-kraju introna od strane U1, a potom i U2 snRNP-a. Uspješno razlikovanje 5'-SS i 3'-SS od brojnih drugih sličnih sljedova u pre-mRNA prvi je preduvjet za uspješno sastavljanje kompleksa za prekrajanje. U vezanju mjesta prekrajanja prilikom sastavljanja kompleksa, kao i više puta kasnije tijekom ciklusa, sudjeluju i molekule RNA i proteini. Dok se RNA sparuju s komplementarnim sljedovima pre-mRNA, proteini stabiliziraju te interakcije, ili i oni sami direktno stupaju u kontakt s reaktivnim nukleotidima pre-mRNA^{6,8}.

U1 snRNP. U1 snRNP koji je u stanici prisutan s ~1 milijun kopija najbrojnija je komponenta kompleksa za prekrajanje RNA^{16,19}. Kod ljudi srž U1 snRNP kompleksa čine U1 snRNA, sedam Sm proteina (SmB/SmB', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF, SmG) i tri specifična proteina U1-70K, U1-A i U1-C. S molekulskom masom od oko 240 kDa, U1 je najmanji od snRNP-ova koji ulaze u sastav kompleksa za prekrajanje^{19,20}. Kod kvasca ovaj kompleks sadrži veću RNA i dodatne proteinske faktore koji nemaju analoge kod viših eukariota⁷. Jednolančana regija na 5'-kraju U1 snRNA očuvana je od kvasca do čovjeka i komplementarno se povezuje s 5'-SS u pre-mRNA²⁰⁻²². Osim ove regije, struktura U1 snRNA uključuje još i četiri uočljive peteljke (eng. *stem-loops*, SL1 – 4), H-zavojnici i Sm-vezujuću jednolančanu regiju (Sl. 3). Po dvije međusobno koaksijalno položene zavojnice (SL1-SL2 i SL3-H zavojnica) formiraju četverostrano križanje (eng. *four-helix junction*) koje je Sm-vezujućom regijom odvojeno od peteljke na 3'-kraju (SL4). Sm proteini tvore heptamerni prsten oko ove jednolančane regije, a U1-70K i U1-A vežu se svojim RNA-vezujućim domenama (eng. *RNA binding domains*, RBDs) na SL1 odnosno na SL2. Protein U1-C (Yhc1 kod kvasca) nema vezno mjesto na U1 snRNA, već uspostavlja interakcije s proteinima U1 snRNP-a. Za njegovo je vezanje nužan U1-70K čiji dugački N-terminalni segment zajedno sa proteinom Sm-D3 tvori utor u koji se veže alfa-zavojnica U1-C²². Smatralo se da U1-C svojim očuvanim aminokiselinskim slijedom u domeni Zn-prstiju sudjeluje u vezanju 5'-SS pre-mRNA^{20,22}. Određivanjem detaljnije kristalne strukture ljudskog U1 snRNP-a pokazano je da U1-C ipak nije u izravnoj interakciji s nukleotidima pre-mRNA, već da prepoznavanje 5'-SS ovisi prvenstveno o termodinamskoj stabilnosti dvostruke uzvojnice koju formiraju 5'-kraj U1 snRNA i 5'-SS pre-mRNA, dok U1-C ima ulogu stabilizacije prilikom vezanja na različite 5'-SS slijedove²¹.



Slika 3. Struktura U1 snRNP. (A) U1 snRNA s označenim elementima sekundarne strukture: SL1 (crveno), SL2 (tamno plavo), SL3 (zeleno), SL4 (svijetlo plavo), Sm-vezujuća regija (žuto), H zavojnica (ljubičasto). (B) U1 snRNA s vezanim 5'-krajem pre-mRNA (sivo) i proteinima u sklopu U1 snRNP-a: U1-C (tamno crveno), U1-70K (narančasto), U1-A (zeleno). Prilagođeno iz ²².

Ne-snRNP. Osim proteina koji dolaze u sastavu U1 snRNP-a, interakcije dviju molekula RNA stabiliziraju i proteini SR (eng. *serine-arginine-rich*), jedni od brojnih ne-snRNP proteinskih faktora koji ulaze u sastav kompleksa za prekrajanje⁶. Uz to što sudjeluju u inicijalnom prepoznavanju 5'-SS od strane U1 snRNA, proteini iz ove skupine stabiliziraju i U6/5'-SS i U5/5'-SS interakcije tijekom prvog, odnosno tijekom drugog katalitičkog koraka. Slijed nukleotida koji sadrži mjesto grananja (BPS) prepoznaje i veže BBP (eng. *branchpoint-binding protein*) – kod čovjeka to je SF1, a kod kvasca *S. cerevisiae* Msl5. Na polipirimidinski slijed (PPT) i na 3'-SS veže se heterodimerni protein U2AF (eng. *U2 auxiliary factor*). U2AF i BBP su međusobno u interakciji preko C terminalne RNA-vezujuće domene (RBD) u većoj podjedinici U2AF65 (65 kDa), pa je njihovo vezanje na pre-mRNA kooperativno, dok manja podjedinica U2AF35 (35 kDa) veže dinukleotid AG u sklopu 3'-mjestu prekrajanja²⁰. Analizom ljudskog genoma utvrđeno je da oko 12% funkcionalnih 3'-SS ne treba vezanje U2AF65 kako bi došlo do sastavljanja kompleksa za prekrajanje, ali nije poznato kako ih kompleks onda prepoznaje¹⁸. Osim na 3'-SS, U2AF65 se može vezati i na neke druge sljedove u pre-mRNA, što predstavlja potencijalni mehanizam alternativnog prekrajanja. Uz to je poznato i da ovaj protein ima dodatne uloge, prvenstveno u transportu zrele mRNA iz jezgre, što je također moguće objašnjenje za njegovo vezanje na različite slijedove¹⁸. Kod kvasca *S. cerevisiae* protein Mud2 je analog U2AF65, no njegovo vezanje nije neophodno za nastavak reakcije, dok kod kvasca *S. pombe* većina introna niti nema PPT, vjerojatno stoga jer su kod kvasca slijedovi BPS, 5'-SSi 3'-SS vrlo dobro očuvani i kao takvi dostatni za navođenje komponenti kompleksa za prekrajanje.

U2 snRNP. Nakon što se vezanjem U1 snRNP i drugih ne-snRNP faktora na kalupu pre-mRNA formira kompleks E, u sljedećem se koraku u sastav kompleksa za prekrajanje uključuje U2

snRNP. Ovaj kompleks, molekulske mase od oko 1,2 MDa, čini U2 snRNA sa 7 Sm proteina i još oko 15 drugih specifičnih proteina¹⁹. U2 snRNA komplementarno se povezuje s mjestom grananja, tvoreći dvostruku uzvojniju iz koje strši katalitički adenozin. Da bi to bilo moguće, najprije se neke od vezanih komponenti istiskuju ili zamjenjuju novim faktorima. Dvije najvažnije proteinske komponente U2 snRNP-a, SF3a i SF3b, tvore multimerne komplekse od tri, odnosno sedam proteina koji vezanjem na pre-mRNA istiskuju BBP te, uz već otprije prisutnu podjedinicu U2AF65, stabiliziraju komplementarno povezivanje U2 snRNA i mjesta grananja. SF3b14 (p14) i SF3b155 još tvore i vezni džep u kojem aromatska aminokiselina stabilizira katalitički adenozin²⁰. Za uspostavljanje interakcija u ovom koraku potreban je ATP, a 5'-SS i 3'-SS sljedovi moraju biti jednolančani jer stvaranje sekundarnih struktura onemogućava vezanje snRNP-ova^{17,23}. S druge strane, neke sekundarne strukture u području introna mogu povećati efikasnost prekrajanja, primjerice kad stvaranje petlje dovodi krajeve introna u međusobnu blizinu. Nakon što se na kalup pre-mRNA vežu komponente U1 i U2 snRNP-ova, formiran je kompleks A u kojem su svi očuvani sljedovi prepoznati od strane odgovarajućih interakcijskih partnera. Kasnije uslijed aktivacije kompleksa i katalitičkih reakcija dolazi do brojnih strukturnih preuređenja te tada drugi proteini i molekule RNA vežu očuvane sljedove pre-mRNA.

2.2 Definiranje preko introna ili eksona

Za razliku od većine drugih makromolekulskih kompleksa u stanici, kompleks za prekrajanje RNA iznova se sastavlja na svakom novom supstratu kojeg procesira, te se nakon dovršetka reakcije rastavlja, a komponente recikliraju. Kooperativne interakcije komponenti kompleksa za prekrajanje s ne-snRNP faktorima omogućavaju točno i precizno postavljanje kompleksa na pre-mRNA. Dva su moguća načina na koje kompleks za prekrajanje prepoznaje i veže odgovarajući supstrat⁶. Jedan je slučaj već opisan – kad su interakcije U1 i U2 snRNP-ova na intronu posredovane proteinom U2AF vezanim na PPT introna koji se izrezuje, kaže se da je kompleks definiran na intronu (eng. *intron-definition*). Na ovaj način kompleks za prekrajanje prepoznaje ispravno mjesto izrezivanja kraćih introna. U slučaju dugačkih introna, komponente kompleksa za prekrajanje sklapaju se na eksonu (eng. *exon-definition*), a ne na intronu. U tom slučaju U1 prepoznaje nizvodni 5'-SS, a U2AF i U2 snRNP vežu uzvodni PPT odnosno BPS. SR proteini vezani u području eksona služe kao medijatori između U2 i U1 snRNP-ova. U nekom trenutku ove eksonske interakcije mijenjaju se interakcijama uspostavljenim preko introna, što omogućava sastavljanje i aktivaciju kompleksa i u konačnici pravilno izrezivanje. Postoji i alternativni model sastavljanja prema kojem se tri-snRNP izravno uključuje u

kompleks definiran preko eksona, a takav se kompleks potom prevodi u kompleks B bez prethodnog formiranja kompleksa na intronu²⁴. Krajnji dio ciklusa koji uključuje katalizu i disocijaciju vrlo vjerojatno je zajednički za komplekse definirane na intronu i na eksonu.

2.3 Cis-djelujući elementi i trans-djelujući faktori

Već je spomenuto da su sljedovi 5'-SS, 3'-SS i BPS relativno degenerirani i kao takvi nisu uvijek dostatni za efikasno usmjeravanje kompleksa za prekrajanje prema ispravnom intronu. Uz njih stoga često u području introna ili eksona dolaze regulacijske regije koje služe kao pojačivači ili utišivači (eng. *exonic splicing enhancers*, ESEs; *exonic splicing silencers*, ESSs; *intronic splicing enhancers*, ISEs; *intronic splicing silencers*, ISSs)^{6,24}. Ovi cis-djelujući elementi reguliraju prekrajanje uglavnom tako što vežu trans-djelujuće proteinske faktore, koji onda pak na sebe vežu elemente kompleksa za prekrajanje, ako su pojačivači, ili onemogućavaju njihovo vezanje, ako se radi o utišivačima. ESEs najčešće vežu SR proteine, a ESSs vežu hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*)⁸. SR proteini djeluju kao pojačivači kad se kooperativno vežu na eksone, ali mogu biti i represori, kad kompetiraju za vezanje na introne¹⁶. Također stimuliraju prekrajanje tako što stabiliziraju RNA-RNA interakcije tijekom sklapanja kompleksa i katalize, a moguće je da analogno tome i hnRNP inhibiraju izrezivanje introna destabilizirajući RNA-RNA interakcije, primjerice vezanjem sljedova koje bi inače u tim interakcijama sudjelovali²³. I hnRNP u nekim slučajevima mogu djelovati kao aktivatori prekrajanja - tako je primjerice hnRNPL utišivač kad je uzvodno, a pojačivač kad je vezan nizvodno od eksona. Jasno je stoga da aktivnost trans-djelujućih faktora često ovisi o poziciji u pre-mRNA na koju su vezani¹⁶. Iako je u pre-mRNA sadržana osnovna informacija koja usmjerava kompleks za prekrajanje, brojni proteini su ti koji osiguravaju nužnu specifičnost, a uspostavljajući mnoštvo slabih interakcija, kako međusobno, tako i s RNA molekulama, zaslužni su i za izuzetnu plastičnost kompleksa. S druge strane, 5'-SS, 3'-SS i BPS regije kvasca karakterizira gotovo savršena komplementarnost s U1 i U2 snRNA, pa u sklopu kompleksa za prekrajanje izostaju SR proteini, a regulacijske regije su jako rijetke.

3. SASTAVLJANJE KOMPLEKSA

3.1 Proteini kataliziraju sastavljanje kompleksa

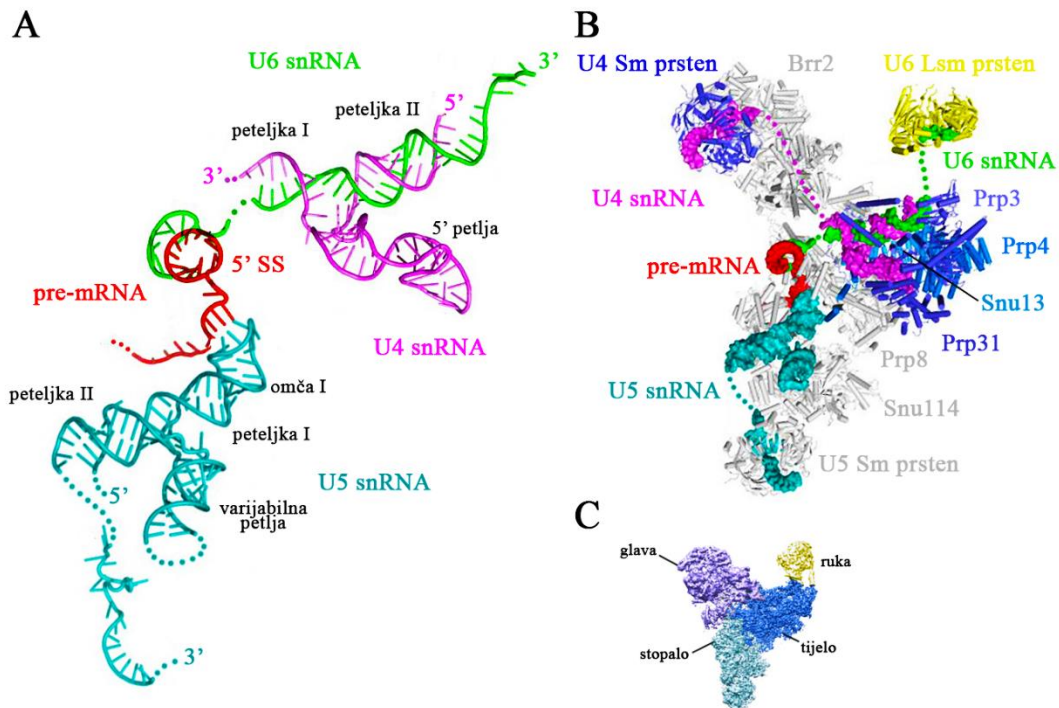
Dok se U1 snRNP na pre-mRNA veže bez utroška ATP-a i prvenstveno zahvaljujući komplementarnosti vlastite RNA, ključnu ulogu prilikom uključivanja U2 snRNP-a u kompleks za prekrajanje imaju dva proteina iz skupine RNA-helikaza/ATPaza koje imaju očuvani DExD/H-slijed, Prp5 i Sub2 (hPrp5 i UAP56 kod čovjeka). Ovi proteini prvenstveno funkcioniraju kao šaperoni – uz hidrolizu vezanog ATP-a uvode promjene u strukturu molekula RNA ili ribonukleoproteinskih kompleksa djelujući kao RNA-helikaze, odnosno RNPaze, a dio ih osim toga ima i lektorirajuću (eng. *proofreading*) aktivnost^{25,26}.

Protein koji veže mjesto grananja, BBP (SF1 kod čovjeka, a Msl5 kod kvasca) i protein vezan na 3'-SS (U2AF kod čovjeka, a Mud2 kod kvasca) tvore heterodimer koji u blizinu ili na samo mjesto grananja dovodi UAP56/Sub2²⁵. RNA-helikaza UAP56/Sub2 potom katalizira otpuštanje jednog ili oba ova proteina s njihovih veznih mjesta na pre-mRNA, čime oslobađa mjesto grananja za vezanje U2 snRNP-a. Zna se da kod čovjeka UAP56 ima uloge i kasnije tijekom ciklusa, kad stupa u izravnu interakciju s U4 i U6 snRNA te vjerojatno potiče njihovo razdvajanje, što je nužno za formiranje aktivnog kompleksa⁶, a osim u reakcijama prekrajanja, ovaj protein sudjeluje i u prijenosu zrele mRNA iz jezgre u citoplazmu²⁵. Nakon vezanja U2 snRNP-a, s kompleksom za prekrajanje asocira se i Prp5 koji katalizira nastanak funkcionalnog U2 snRNP-a^{25,27}. Prp5 direktno veže U2 snRNA u području ili u blizini BSL regije (eng. *branchpoint-interacting stem-loop*) te istiskuje U2 snRNP protein Cus2 s njegovog veznog mjesta na U2 snRNA, uslijed čega se formira bitna katalitička struktura u ovoj RNA, petlja IIa²⁵, o kojoj će više riječi biti u nastavku. Za ovu funkciju proteina Prp5 ključna je njegova ATPazna aktivnost. Prp5 usto neovisno o hidrolizi ATP-a sudjeluje u osiguravanju točnosti reakcija prekrajanja tako što obično nakon obavljanja svoje funkcije disocira s kompleksa, no u slučaju da vezana pre-mRNA ima mutiran nukleotidni slijed u mjestu grananja, protein ostaje vezan i sprječava daljnje reakcije (konkretno, onemogućava vezanje tri-snRNP-a) te označava takav kompleks za razgradnju²⁷. Kod kvasca *S. pombe* i kod ljudi Prp5 ima dodatnu N-terminalnu domenu u području koje veže U1 i U2 snRNP i na taj ih način premošćuje. Kod *S. cerevisiae* nema ove domene pa stoga izostaje i premosna aktivnost Prp5²⁵. Osim opisanih izravnih interakcija koje uspostavlja, mutacijskim istraživanjima pokazano je da je Prp5 u genetičkoj interakciji i s drugim proteinima U2 snRNP-a, konkretno s Prp9, Prp11, Prp21 i Cus1 (SF3a i SF3b kod čovjeka)²⁵.

Sljedeći korak u ciklusu kompleksa za prekrajanje je vezanje U4, U5 i U6 snRNP-ova. Ovi ribonukleoproteinski kompleksi dolaze kao U4/U6 di-snRNP i U6 snRNP te se prije uključivanja u kompleks za prekrajanje međusobno vežu u stabilni U4/U6.U5 tri-snRNP. U sastav kompleksa na ovoj razini uključuje se ~25 snRNP proteina, a osim njih još i više od 35 ne-snRNP proteinskih faktora koji dolaze u sklopu NTC (eng. *Nineteen complex*, Prp19/CDC5 kod ljudi) i RES (eng. *retention and splicing*) kompleksa^{6,8}. Budući da ovi kompleksi ključne funkcije imaju tijekom katalitičkih reakcija prekrajanja, o njihovom će proteinskom sastavu, strukturi i ulogama više riječi biti u petom poglavlju. Asocijacijom svih spomenutih komponenata nastaje penta-snRNP intermedijer u kompleksu prekrajanja koji se još naziva i prekatalitičkim kompleksom ili kompleksom B. Važnu ulogu u formiranju kompleksa B ima Prp28, još jedna RNA-helikaza iz obitelji enzima koji sadrže DExD/H slijed. Prp28 dolazi u sastavu U5 snRNP-a i djeluje tako što narušava interakcije između U1 snRNA i 5'-SS u pre-mRNA, omogućavajući stabilno vezanje U6 na 5'-SS i potičući disocijaciju U1 snRNP-a u sljedećem koraku. Pokazano je da je aktivnost ovog enzima u normalnim uvjetima kod kvasca esencijalna za sastavljanje kompleksa za prekrajanje, ali nije nužna ako je u stanicama mutiran protein U1-C koji stabilizira spomenute RNA interakcije^{26,28}. Prp28 također provjerava točnost zamjene U1 sa U6 snRNA, ovisno o relativnoj stabilnosti interakcija koje uspostavlja sa svakom od ovih dviju molekula RNA^{6,26}.

3.2 U4/U6.U5 tri-snRNP

Tri molekule RNA i preko 30 proteina međusobno se povezuju u stabilni U4/U6.U5 tri-snRNP kompleks (Sl. 4). Izolirani tri-snRNP kvasca *S. cerevisiae* ima trokutast oblik, a tri uočljive regije nazvane su glavom, stopalom i rukom, uz središnji dio koji čini tijelo kompleksa (Sl. 4C)^{29,30}. U5 snRNP zauzima tijelo, stopalo i glavu, a U4/U6 di-snRNP je u području ruke. Središnjim dijelom kompleksa dominira protein Prp8 koji je u sastavu U5 snRNP-a. Na jednom kraju U5 snRNP-a smješteni su GTPaza Snu114 i heptamerni U5 Sm prsten koji imaju dobro definirane strukturne karakteristike, dok je drugi kraj, koji sadrži helikazu/ATPazu Brr2 i U4 Sm prsten, izuzetno fleksibilan. U4/U6 snRNA i asociirani proteini također su dobro strukturirani, no u njihovoj neposrednoj blizini je 3'-kraj U6 snRNA s vezanim Lsm prstenom za koje je utvrđeno da mogu dolaziti u različitim položajima u odnosu na ostatak kompleksa i koji su odgovorni za fleksibilnost domene ruke (Sl. 4B). Smatra se da je ova fleksibilnost ključna za regulaciju aktivacije kompleksa.



Slika 4. Struktura U4/U6.U5 tri-snRNP. (A) Molekule RNA u sastavu U4/U6.U5 tri-snRNP-a, s dijelom vezane pre-mRNA i s označenim ključnim elementima sekundarne strukture: U5 snRNA (tirkizno), U4 snRNA (ljubičasto), U6 snRNA (zeleno), pre-mRNA (crveno). (B) Struktura U4/U6.U5 tri-snRNP-a s vezanom pre-mRNA. Proteini u sastavu U5 snRNP-a: U5 Sm prsten, Snu114, Brr2 (sivo); proteini u sastavu U4 snRNP-a: U4 Sm prsten, Prp3, Prp4, Snu13, Prp31 (plavo); U6 Lsm prsten (žuto); snRNA kao i pod A. (C) Četiri velike podjedinice U4/U6.U5 tri-snRNP. Prilagođeno iz ^{13,30}.

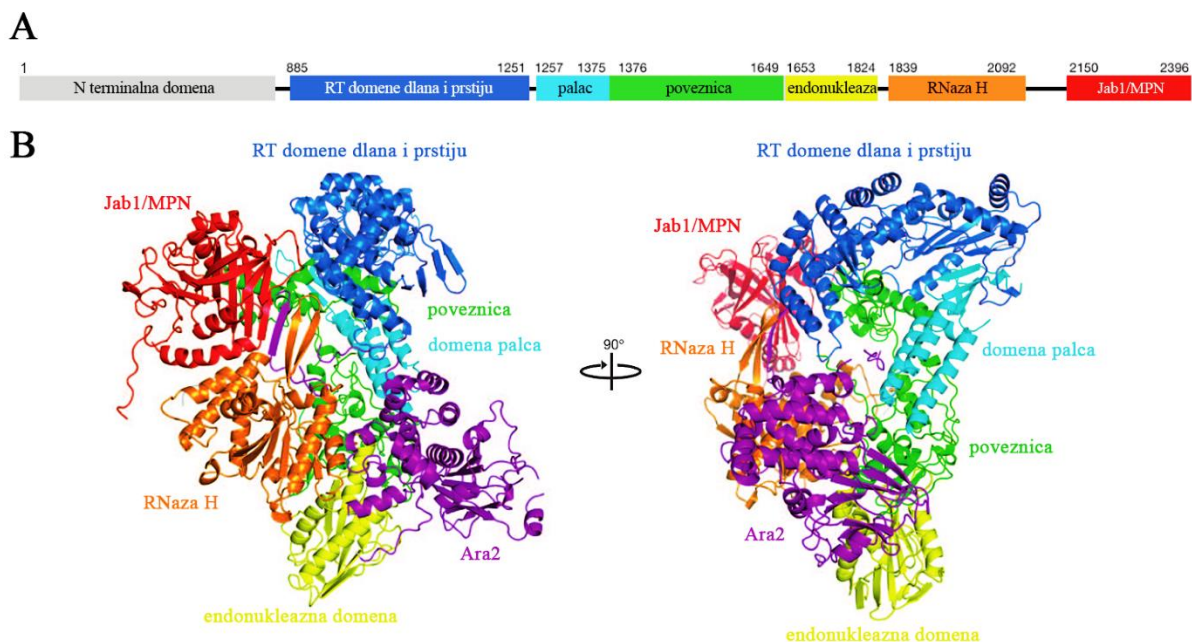
U5 snRNA. Struktura U5 snRNA kvasca *S. cerevisiae* sadrži omču I (eng. *Loop I*), peteljke I i II (eng. *Stem I*, *Stem II*), i varijabilnu petlju (eng. *Stem Loop*) koja, iako je dulja, odgovara omči II (eng. *Loop II*) u kvascu *S. pombe*, te produljeni 3' kraj (Sl. 4A)¹³. Dijelovi koji u aktivnom kompleksu za prekrajanje tvore omču III (eng. *Loop III*) i peteljkicu III (eng. *Stem III*) u izoliranom su kompleksu neuređeni. Omča I U5 snRNA komplementarno se sparuje s nukleotidima eksona blizu 5'-SS.

U4/U6 snRNP. U izoliranom tri-snRNP-u, kao i u sklopu kompleksa B, U4 i U6 snRNA komplementarno se povezuju i tvore dvostruku zavojniju u području dviju regija, nazvanih peteljka I i II (eng. *Stem I*, *Stem II*), između kojih dvije komplementarne regije U4 snRNA formiraju 5'-petlju (*5'-stem loop*) (Sl. 4A). Općenito je organizacija U4/U6 di-snRNP-a kod kvasca i čovjeka slična, iako postoje razlike u arhitekturi pojedinih proteina^{13,29-31}. Prp3 je glavni protein u sklopu U4/U6 snRNP-a. Ima ispruženu konformaciju i dvije α zavojnice u N-terminalnoj regiji koje su u interakciji s peteljkom II U4/U6 snRNA dupleksa te C-terminalnu domenu koja uspostavlja direktne interakcije s 5'-krajem U4 snRNA i s fosfodieterskom okosnicom jednolančane regije U6 snRNA u području oko katalitičkog nukleotida U80. C

terminalna domena Prp3 je isto i u kontaktu s LSm heptamernim prstenom vezanim na 3'-kraj U6 snRNA. Prp3 tvori dimer s još jednim U4 proteinom, Prp4, tako što svojom domenom nalik feredoksinskom motivu (eng. *ferredoxin-like*) uspostavlja interakciju s domenom Prp4 koja sadrži očuvane WD40 strukturne motive. U4 snRNP protein Prp31, slično kao i Prp3, također ima ispruženu konformaciju. N-terminalna domena Prp31 sadrži α -zavojnice koje su u interakciji s vrhom 5'-petlje U4 snRNA, a ispruženi polipeptidni lanac prati ovu petlju prema 3'-kraju i ulazi u veliki utor peteljke I, gdje pozitivno nabijene aminokiseline Prp31 uspostavljaju interakcije s bazama U4 i U6¹³. U sastav U4/U6 snRNP-a ulazi još jedan protein, Snu13. Ovaj globularni RNA-vezujući protein smješten je između peteljke II u U4/U6 zavojnici i 5'-petlje U4 snRNA. Snu13 prvi uspostavlja kontakt s RNA tako što veže izbočenje pri vrhu 5'-petlje U4 snRNA, a potom inducira vezanje Prp31 i dimera Prp3-Prp4^{13,32}. U sastavu kompleksa za prekrajanje na U4/U6 snRNA direktno je vezan još i protein Prp6, koji nije dio U4/U6 di-snRNP-a, već je specifičan isključivo za tri-snRNP¹³. U izoliranom U4/U6 di-snRNP-u katalitički nukleotid U80 u U6 snRNA, koji sudjeluje u prvom koraku reakcije prekrajanja, komplementarno je povezan na kraju peteljke II s A1 u U4 snRNA i na taj način inaktiviran jer ispružena konformacija fosfodiesterne okosnice onemogućava koordinaciju katalitičkih Mg²⁺ iona, a fosfati U80 vjerojatno isto tvore vodikove veze s bočnim ograncima aminokiselina u Prp3¹³. Na ovaj je način efikasno spriječena prijevremena aktivacija kompleksa za prekrajanje.

Prp8. Najveći i evolucijski najbolje očuvan protein u kompleksu za prekrajanje je Prp8 (Spp42 kod kvasca *S. pombe*) koji dolazi u sklopu U5 snRNP-a. Postoji 63% odnosno 73% podudarnosti u aminokiselinskim sljedovima Spp42 kod kvasca *S. pombe* i Prp8 kod kvasca *S. cerevisiae*, odnosno kod ljudi⁹. Ovaj pseudo-enzimski konglomerat³³ sadrži četiri domene – N-terminalnu domenu, srž, domenu nalik RNazi H (eng. *RNaseH-like*) i C-terminalnu Jab1/MPN domenu (Sl. 5). Srž Prp8, koja se još naziva i velikom domenom, sastoji se od manjih domena nalik dlanu i prstima reverznih transkriptaza (RT, eng. *Reverse Transcriptase-like fingers/palm*), domene palca (eng. *Thumb/X*), poveznice (eng. *Linker*) i domene nalik endonukleaznoj (eng. *type II Endonuclease-like*). Upravo je Prp8, sa svojim domenama koje nalikuju aktivnim enzimskim centrima i s visokom razinom evolucijske konzerviranosti, dugo bio glavni kandidat za katalitički aktivnu molekulu kompleksa za prekrajanje. Detaljnija istraživanja pokazala su ipak da RT sadrži samo jedan od tri aspartata koji inače koordiniraju Mg²⁺ u aktivnom mjestu ovakvih polimeraza, a iako domena koja nalikuje endonukleaznoj ima sve aminokiseline koje inače kod ovih enzima vežu Mn²⁺, u strukturi Prp8 njihovi bočni ogranci uspostavljaju interakciju s polipeptidnom petljom, a ne s dvovalentnim kationima. Domena koja

je nalik aktivnom mjestu ribonukleaza H razlikuje se od katalitički aktivne domene jer joj u aktivnom mjestu nedostaju dva od četiri negativno nabijena aminokiselinska bočna ogranka uključena u koordinaciju katalitičkih Mg^{2+} iona. Isto tako, i Jab1/MPN motiv u C-terminalnoj domeni promijenjen je u odnosu na takav motiv koji obično dolazi u deubikvitinacijskim metaloenzimima. Sve ovo upućuje na zaključak da protein Prp8 ne sudjeluje izravno, kao katalitička komponenta, u reakcijama prekrajanja³³. Unatoč tome, ovaj protein ostvaruje brojne interakcije s drugim komponentama kompleksa te služi kao glavno mjesto vezanja različitih faktora prekrajanja, a uključen je i u pozicioniranje supstrata te je usko povezan s katalitičkom RNA u srži kompleksa^{13,28}. *RNaseH-like* domena je tako u kontaktu s tri-snRNP-specifičnim proteinom Prp6, a srž je preko proteina Prp3 i Prp31 povezana s U4/U6 dvostrukom uzvojnicom. Sržna je domena usto u interakciji s Prp28, a C-terminalna Jab1/MPN domena istovremeno je u izravnoj fizičkoj asocijaciji s Brr2. Na taj način Prp8 regulira aktivnost dviju RNaza ključnih u aktivaciji kompleksa za prekrajanje²⁸. N terminalni dio Prp8 sadrži dvije domene (NTD1, NTD2) međusobno povezane kratkom poveznicom (NTDL, eng. *linker*), od kojih NTD1 veže U5 snRNA i GTPazu Snu114. Struktura ove domene veoma je slična u tri-snRNP čovjeka i kvasca *S. pombe*. Isto su tako položaj i struktura domena u srži Prp8 esencijalno isti kod ljudi i kod kvasca, osim domene nalik RNazi H koja je kod kvasca rotirana za 180° u odnosu na istu domenu u kompleksu za prekrajanje kod čovjeka^{29,31}.



Slika 5. Struktura Prp8. Raspored domena u primarnoj (A) i u tercijarnoj (B) strukturi Prp8, s vezanim Ara2: N-terminalna domena (sivo), domena nalik dlanu i prstima reverzne transkriptaze (tamno plavo), domena palca (svjetlo plavo), domena koja djeluje kao poveznica (zeleno) i domena nalik endonukleaznoj (žuto), domena nalik RNazi H (narančasto) i Jab1/MPN domena (crveno), Ara2 (ljubičasto). Prilagođeno iz³³.

Prp6. Prp6 je protein karakterističan za tri-snRNP i nužan za sastavljanje kompleksa jer djeluje kao most između U5 i U4/U6 snRNP-ova¹³. U strukturi proteina dolaze 44 alfa zavojnice, od kojih je većina organizirana u TPR motive (tetratrikopeptidni strukturni motivi, ponavljajući parovi alfa zavojnica). N-terminalne zavojnice Prp6 u kontaktu su s domenom nalik RNazi H i sa srži Prp8, u sklopu U5 snRNP-a, dok je C-terminalna domena u interakciji s proteinima Prp4, Snu13 i Prp31 te s vrhom 5'-petlje U4 snRNA, koji svi dolaze u sastavu U4 snRNP-a^{13,30}. Izuzetan značaj Prp6 za sastavljanje kompleksa očit je s obzirom na brojnost interakcija koje ovaj protein ostvaruje s komponentama U4/U6 snRNP-a i Prp8.

3.3 Formiranje katalitičkog centra

Pomicanjem N-terminalne domene i srži Prp8 jedne u donosu na drugu već u inaktivnom tri-snRNP-u formira se šupljina koja će tvoriti katalitički centar kompleksa za prekrajanje. U ovoj fazi ona je doduše pogrešno pozicionirana, a rotacijom za oko 30° dobije se katalitički ispravna konformacija, kakva dolazi u sastavljenom kompleksu za prekrajanje^{13,30}. Na površini Prp8 izloženi su ključni sljedovi molekula RNA koje sudjeluju u prvom koraku reakcije (5'-SS-vezujući ACAGAG slijed U6 snRNA i sljedovi koji se sparuju s U2 snRNA te omča I U5 snRNA koja je u interakciji s 5'-eksonom pre-mRNA). Ova je površina djelomično zaklonjena vezanjem Dib1, evolucijski očuvanog proteina u sastavu U5 snRNP-a. Dib1 vjerojatno ima ulogu u regulaciji uključivanja RNA komponenti u šupljinu aktivnog mjesta tijekom sklapanja i aktivacije kompleksa, a u interakciji je s Prp31, N-terminalnim zavojnicama Prp8, s omčom I u U5 snRNA i s 5'-SS pre-mRNA^{13,29}. Osim što katalitički centar kompleksa za prekrajanje, iako inaktivan, nastaje već prilikom sastavljanja tri-snRNP-a, utvrđeno je i da se na njega već tada veže pre-mRNA u konformaciji pogodnoj za prvu transesterifikacijsku reakciju (u interakciji s omčom I U5 snRNA i ACAGAG slijedom U6 snRNA te s katalitičkim Mg²⁺ ionima u blizini nukleotida pre-mRNA koji ih koordiniraju). Kako su i neki drugi segmenti tri-snRNP-a već u katalitički aktivnim konformacijama, uključujući N-domenu Prp8, Snu114 i U5 snRNA, to nesumnjivo upućuje na mogućnost postojanja alternativnog mehanizma sastavljanja kompleksa za prekrajanje, u kojem bi se potpuno zaobišlo vezanje U1 snRNA na pre-mRNA¹³.

4. AKTIVACIJA

Nakon što je povezivanjem tri-snRNP-a s kompleksom A nastao penta-snRNP, ili kompleks B, u sljedeća dva koraka ovaj se kompleks aktivira da bi mogao katalizirati prvu reakciju prekrajanja.

4.1 Nove RNA interakcije

U4 snRNA disocira s kompleksa, a uspostavlja se ekstenzivna mreža interakcija između U2, U6, U5 snRNA i pre-mRNA³⁴. Najvažniju reakciju, odvijanje dvostruke uzvojnice U4/U6 snRNA, katalizira helikaza Brr2, pri čemu dolazi do disocijacije U4 snRNA, a U6 prolazi kroz opsežne strukturne promjene, tako da su ključni katalitički nukleotidi U6 snRNA u izoliranom tri-snRNP-u kvasca *S. cerevisiae* čak do 100 Å udaljeni u odnosu na njihov položaj u katalitički aktivnom kompleksu za prekrajanje¹³. Očuvani slijed ACAGAG blizu 5'-kraja U6 snRNA, koji je bio u interakciji s U4 snRNA, sada se povezuje s 5'-SS introna, pri čemu istiskuje otprije vezanu U1 snRNA, a dolazi i do ekstenzivnog povezivanja U6 snRNA s U2 snRNA koje tako tvore dvije intermolekulske dvolančane zavojnice. Novoformirane RNA interakcije pozicioniraju 5'-SS i BPS za prvi katalitički korak prekrajanja, a usto središnje regije U6 tvore intramolekularnu petlju ISL (eng. *intramolecular stem-loop*) koja ima ključnu ulogu u katalizi jer koordinira Mg²⁺ ione³⁴. Tek tada, nakon prepoznavanja svih očuvanih sljedova od strane ispravnih veznih partnera, poprima se katalitički aktivna struktura – na ovaj je način vrlo efikasno osigurano da već u fazi aktivacije kompleksa ne dođe do prijevremenog ili nepreciznog izrezivanja introna^{24,28}.

4.2 Proteini aktiviraju kompleks za prekrajanje

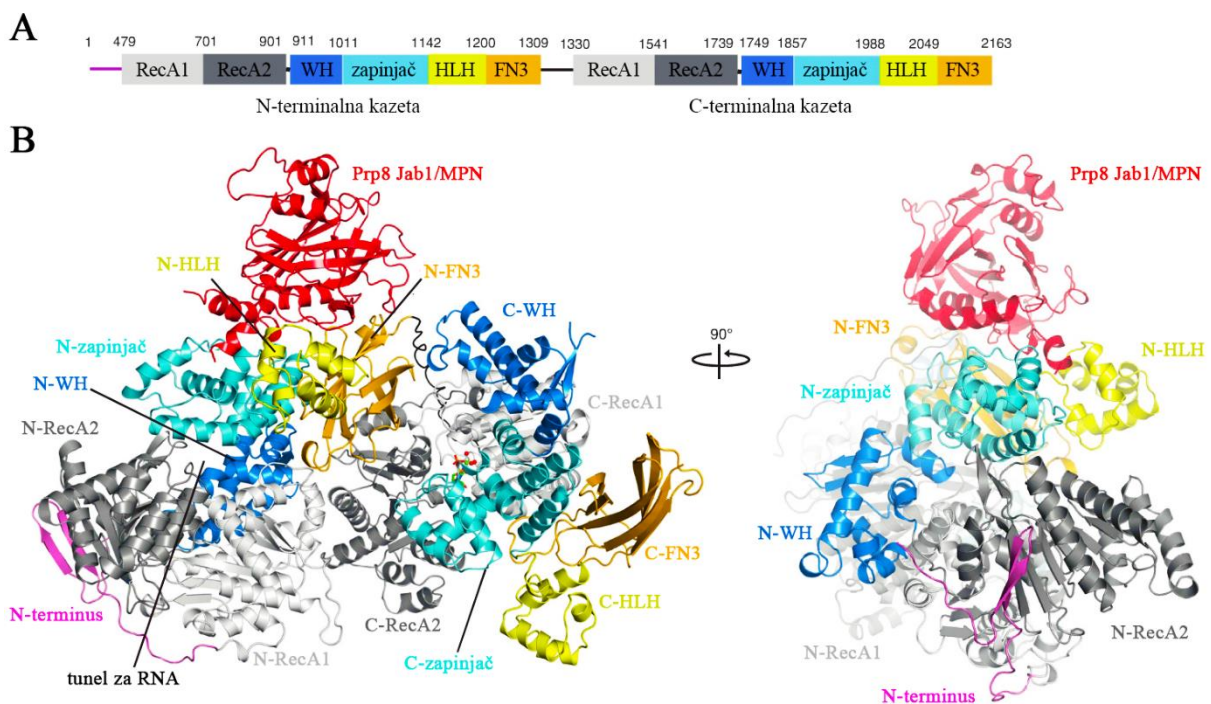
Proteini kataliziraju strukturne promjene koje su potrebne da bi kompleks za prekrajanje poprimio katalitički aktivnu konformaciju. Za prelazak iz B u B^{act} ključni su proteini U5 snRNP-a Brr2, Snu114 i Prp8.

Brr2. Glavnu ulogu u aktivaciji kompleksa za prekrajanje ima Brr2, oko 250 kDa velika RNA-helikaza iz skupine proteina koji sadrže DExD/H-slijed, a koja katalizira odvijanje U4/U6 snRNA i posljedičnu disocijaciju U4 snRNP-a^{25,26}. Kad se iz citoplazme unosi u jezgru stanice, kompleks tri-snRNP umjesto Brr2 ima vezan analog faktora za prekrajanje Aar2. Ovaj je protein odgovoran za čvrstu asocijaciju C-terminalne Jab1/MPN domene i domene nalik RNazi H (eng. *RNaseH-like*) sa srži Prp8, koje su inače povezane samo dvjema neuređenim

poveznicama od otprilike 10, odnosno 70 aminokiselina³². Aar2 se veže na srž Prp8, a njegov produljeni C-terminalni dio umeće se između Jab1/MPN i *RNaseH-like* domena te ih povezuje tako što s njima tvori intermolekulska β -ploču (Sl. 5). Dok je na tri-snRNP vezan Aar2, vezno mjesto za Brr2 u Jab1/MPN domeni nije zauzeto, no jako blizak razmještaj domena u takvom kompleksu efektivno sprječava vezanje Brr2. Tek nakon što se fosforilira, Aar2 disocira s kompleksa, a Brr2 se veže³³. Jab1/MPN i Brr2 tvore stabilan kompleks koji se u ljudskom i kvašćevom tri-snRNP-u nalazi na različitim pozicijama. Kod ljudi je helikaza hBrr2 smještena blizu N-terminalnih TPR ponavljanja u Prp6 i RT domene Prp8, dok s druge strane kvaščevo yBrr2 dolazi blizu endonukleazne domene Prp8, što je oko 20 nm dalje, a također je i rotirana za otprilike 180° oko dugačke osi tri-snRNP-a³¹. Malo je vjerojatno da je različita pozicija kvaščeve i ljudske Brr2 posljedica značajne razlike u prostornoj organizaciji tri-snRNP-ova, jer su strukture većine glavnih proteina U5 snRNP-a uglavnom evolucijski dobro očuvane. Vjerojatnije je da ove dvije strukture predstavljaju dva različita konformacijska stanja koja se poprimaju proteinskim pregrađivanjima tijekom aktivacije kompleksa za prekrajanje. U prilog takvom tumačenju ide i činjenica da je u ljudskom kompleksu prisutan protein Sad1, koji nije detektiran u tri-snRNP kompleksu kvasca. Sad1 funkcionira poput hvataljke, stabilizira interakcije U4/U6 s U5, a vjerojatno stabilizira i Brr2 u pre-aktivacijskoj poziciji. Disocijacija Sad1 tijekom aktivacije kompleksa B omogućava Brr2 da prolazi kroz ključne konformacijske promjene nužne za interakciju s U4/U6 snRNA supstratom. Budući da Sad1 nije detektiran u kvašćevu tri-snRNP-u, moguće je da drugačiji položaj yBrr2 predstavlja konformacijsko stanje slično onom koje i hBrr2 poprima u kasnijoj fazi aktivacije kompleksa za prekrajanje.

Kao što je već rečeno, protein Brr2 je helikaza iz skupine enzima za koje je karakterističan DExD/H slijed. U strukturi Brr2 dolaze dvije helikazne kazete (Sl. 6), od kojih svaka sadrži dvije RecA domene (RecA1, RecA2), zatim tzv. „krilati“ zavojnica-okret-zavojnica motiv (WH, eng. *winged helix*), motiv zapinjača (eng. *Ratchet*) i proteinski motiv zavojnica-omča-zavojnica (HLH, eng. *helix-loop-helix*), te domenu koja je nalik fibronektinskim domenama tipa 3 (FN3, eng. *fibronectin3-like*)³³. Samo N-terminalna kazeta (NC) je funkcionalna tijekom razdvajanja U4/U6 snRNA, dok su u C-terminalnoj kazeti (CC) glavne domene mutirane i prvenstveno uspostavljaju interakcije s drugim proteinima, a ne s RNA, pa se stoga pretpostavlja da imaju regulacijske, a ne katalitičke uloge^{26,32,35}. Među domenama zapinjača, WH, RecA1 i RecA2 u NC formira se tunel (Sl. 6B) u koji se veže jednolančana regija U4 snRNA između petlje na 3'-kraju i slijeda koji komplementarnim povezivanjem s U6 snRNA tvori peteljku I³². HLH u N-terminalnoj kazeti uspostavlja interakcije s 3'-petljom U4 snRNA i

smatra se da je upravo ta interakcija važna za postavljanje RNA u aktivno mjesto Brr2²⁹. Kod kvasca je NC u neposrednoj blizini jednolančane regije U4 snRNA koju veže, ali nasuprot tome, u strukturi ljudskog tri-snRNP-a, aktivna N-terminalna kazeta hBrr2 smještena je 8-10 nm dalje od svog U4/U6 snRNA supstrata^{29,31}. Translokacijom niz U4 snRNA u 3' – 5' smjeru helikaza razdvaja dvolančane U4/U6 RNA segmente. Budući da je Brr2 na domenu Prp8 nalik RNazi H vezan fleksibilnim linkerom, Brr2 i U4/U6 di-snRNP se tijekom reakcije odvajaju od srži Prp8^{29,30}. Na ovaj način Brr2 može sudjelovati i u drugim reakcijama – zna se da regulira aktivnost proteinskih faktora koje veže u području svoje C-terminalne domene (Prp2, Prp16, Slu7, Ntr2) i da sprječava prijevremeno razdvajanje kompleksa jer kompetira za vezanje Ntr2, o čemu će više govora biti u nastavku²⁶.



Slika 6. Struktura Brr2. Raspored domena u primarnoj (A) i u terciarnoj (B) strukturi Brr2 s vezanom Jab1/MPN domenom Prp8. N-terminalna i C-terminalna helikazna kazeta svaka imaju po dvije RecA domene, RecA1 (svijetlo sivo) i RecA2 (tamno sivo), tzv. „krilati“ zavojnica-okret-zavojnica motiv, WD (tamno plavo), motiv zapinjača (svijetlo plavo), motiv zavojnica-omča-zavojnica, HLH (žuto) i domenu koja je nalik fibronektinskim domenama tipa 3, FN3 (narančasto). Prikazana je Jab1/MPN domena (crveno) kojom Prp8 veže Brr2 a označen je i tunel kroz koji prolazi RNA, supstrat helikaze Brr2. Prilagođeno iz³³.

Regulacija aktivacije. Budući da Brr2 dolazi u sastavu U5 snRNP-a, helikazna aktivnost ovog enzima strogo je regulirana djelovanjem Snu114 i Prp8, kako ne bi došlo do prijevremenog razdvajanja U4/U6 već prilikom formiranja U4/U6.U5 tri-snRNP-a^{28,29}. Domena tri-snRNP-a koja uključuje U4/U6 snRNA, nazvana rukom (Sl. 4C), zauzima različite pozicije u odnosu na ostatak kompleksa, na osnovi čega je predloženo da Brr2, u domeni glave, veže i razdvaja

U4/U6 snRNA onda kad Snu114 dovede domene ruke i glave u neposrednu blizinu²⁹. Iako se zna da Snu114 regulira aktivnost Brr2 u ovisnosti o vezanom GTP-u, točan mehanizam djelovanja još uvijek nije razjašnjen^{29,30}. Uočena je izuzetna sličnost proteinskih sljedova Snu114 i prokariotskih (EF-G), odnosno eukariotskih elongacijskih faktora (eEF2), na osnovi čega se pretpostavljalo da Snu114 inducira konformacijske promjene kompleksa za prekrajanje uz vezanje i hidrolizu GTP-a, slično kao što ovi faktori ovisno o hidrolizi GTP-a reguliraju translokaciju ribosoma u procesu translacije²⁹. U većini GTPaza katalitički glutamin pozicionira molekulu vode u blizinu γ -fosfata GTP-a i na taj način omogućava hidrolizu fosfatnog estera. Kao što je to slučaj kod elongacijskih faktora, i u Snu114 je katalitički glutamin zamijenjen histidinom, no u Snu114 se bočni ogranak ovog histidina vodikovim vezama sparuje s tirozinom u Prp8, što sprječava njegovu slobodnu rotaciju prema γ -fosfatu GTP-a. Na taj je način inaktivirana GTPazna aktivnost Snu114, a budući da je vezno mjesto za GTP smješteno na dodirnoj površini Snu114 i N-terminalne domene Prp8, u takvoj strukturi ne preostaje ni dovoljno prostora da neki od proteina dođe u kontakt s GTPaznim aktivnim mjestom i djeluje kao aktivirajući protein (eng. *GTPase activating protein*, GAP)³⁰. Stoga je vrlo vjerojatno da Snu114 veže GTP, ali se on ne hidrolizira tijekom reakcija prekrajanja, već na neki drugi način sudjeluje u regulaciji³². Jedan mogući scenarij uključuje očuvani slijed ACAGAG u U6 snRNA, čije je komplementarno sparivanje s 5'-SS pre-mRNA kontrolna točka u kojoj se provjerava ispravnost sastavljanja kompleksa B prije razdvajanja U4/U6 snRNA. Pokazano je da se ova kontrolna točka može zaobići indukcijom alosteričkih promjena na dodirnim površinama ključnih komponenti kompleksa (Prp8 i Snu114, Prp8 i Prp31) za koje se pretpostavlja da ovise o tome je li na Snu114 vezan GDP ili GTP²⁹. Osim Snu114, u regulaciji aktivacije kompleksa za prekrajanje sudjeluje i protein Prp8. Regija na samom kraju C terminalne Jab1/MPN domene Prp8 je kod kvasca nestrukturirana, dok u ljudskom homologu poprima ispruženu konformaciju koja se veže u tunel za RNA u strukturi Brr2 i tako sprječava preuranjeno razdvajanje U4/U6 snRNA, a na isti način i inhibira enzim nakon aktivacije kompleksa^{33,35}. Kad je Prp8 u sastavu tri-snRNP-a, Jab1/MPN domena veže ubikvitin, što ukazuje i na ubikvitinaciju kao jedan od mogućih mehanizama regulacije aktivnosti Brr2. Uz Brr2 na C kraju, Prp8 svojim N-krajem veže i Snu114 pa ova tri proteina tvore kompleks koji je stabilan pri visokoj koncentraciji soli te ga je moguće izdvojiti od U5 snRNP-a⁸. Stoga se zaključuje da su u sklopu kompleksa za prekrajanje Prp8, Brr2 i Snu114 organizirani kao jedinstvena funkcionalna cjelina.

4.3 Novi proteini se asociraju s kompleksom tijekom aktivacije

Dinamične promjene proteinskog sastava kompleksa za prekrajanje najopsežnije su prilikom prelaska iz B u B^{act} kompleks⁷. Kod kvasca ~35 proteina disocira, uključujući sve proteine povezane s U1 i U4/U6 snRNP-ovima i neke specifične za U5 snRNP, a istovremeno u sastav kompleksa ulazi 12 novih proteina koji stabiliziraju novoformirane RNA interakcije, poput Cwc2, ili su nužni za sljedeći korak ciklusa, kao primjerice Spp2 i Prp2. I otprije vezani proteini uspostavljaju nove interakcije – na U6 snRNA se tako vežu SR proteini i NTC (Prp19/CDC5). Potonji kompleks vezanjem uzrokuje disocijaciju LSm heptamernog prstena s 3'-kraja U6 snRNA, a veže se i na U5 snRNA te precizno koordinira i stabilizira interakcije U5 i U6 neposredno prije katalize⁶.

Prp2. Važna konformacijska promjena prilikom aktivacije kompleksa i kod kvasca i kod čovjeka je pregradnja U2 snRNP-a koju katalizira helikaza Prp2, još jedan enzim iz skupine helikaza s DExD/H slijedom^{25,26}. Prp2 katalizira prelazak aktiviranog kompleksa u konformaciju koja može katalizirati prvi korak reakcije prekrajanja (B^{act} u B*). Smatralo se da je za vezanje Prp2 na kompleks potreban Spp2, ali novija istraživanja su pokazala da nije neophodan, već da stimulira ATPaznu aktivnost enzima, dok Cwc22 održava njegovu asocijaciju s kompleksom za prekrajanje²⁵. Prp2 je najprije vezan od strane Brr2, a potom se veže na pre-mRNA, niz koju se pokreće uz hidrolizu ATP-a te istiskuje SF3a i SF3b, komponente U2 snRNP vezane na mjesto grananja. Njihova disocijacija ne samo da oslobađa BPS za vezanje faktora prekrajanja Yju2 i Cwc25 koji stabiliziraju prvi katalitički korak, nego i uslijed smanjene krutosti katalitičkog centra omogućava da ključni elementi RNA molekula uspostave interakcije koje dovode od katalitičke reakcije^{25,36}.

Cwc2. U6 snRNP se također pregrađuje prilikom aktiviranja kompleksa za prvi katalitički korak reakcije prekrajanja. Ovu reakciju katalizira NTC proteinski faktor Cwc2 (Cwf2 kod *S. pombe*, RBM22 kod ljudi) koji u svojoj strukturi ima dvije domene za vezanje nukleinskih kiselina – domenu Zn prstiju i motiv koji prepoznaje RNA (RRM, *RNA recognition motif*) – i koji specifično veže U6 ISL i gvanin (G39 u *S. cerevisiae*, odnosno G27 u *S. pombe*) uzvodno od ACAGAG slijeda³². Pretpostavlja se da na taj način, dovođenjem udaljenih segmenata U6 u neposrednu blizinu, prevodi U6 u katalitički aktivnu konformaciju^{32,33}. Kasnije je u strukturi U2.U6.U5 kompleksa Cwc2 udaljen od ISL, dok je interakcija s gvaninom zadržana, što implicira da, iako su obje interakcije Cwc2 bitne za uspostavljanje strukture katalitičkog centra kompleksa, samo je potonja nužna za njeno održavanje³².

5. KATALIZA

Za razliku od drugih enzima i enzimskih kompleksa u stanici, kompleks za prekrajanje nema unaprijed formiran katalitički centar u koji veže supstrate, već on nastaje sklapanjem i strukturnim razmještanjem komponenti kompleksa na kalupu pre-mRNA^{6,8}. Kompleks za prekrajanje je metaloenzim – više očuvanih nukleotida snRNA molekula u katalitičkom centru koordiniraju svaki barem po dva Mg^{2+} koji kataliziraju dvostupanjsku reakciju izrezivanja, a oba reakcijska koraka mehanistički su transesterifikacijske reakcije S_N2 tipa³⁴.

5.1 Dvije konformacije aktivnog mjesta

Katalitički aktivan kompleks za prekrajanje postoji u dinamičkoj ravnoteži između dviju različitih konformacija – B*, koja katalizira prvi korak, odnosno cijepanje 5'-SS introna, i C, koja katalizira drugi korak reakcije, odnosno ligaciju eksona²³. Ove dvije konformacije međusobno su u kompeticiji, a kompleks aktivno prelazi između jedne i druge preko tzv. otvorene konformacije u kojoj je omogućeno premještanje i ispravno pozicioniranje omčastog intermedijera, i za koju se smatra da uključuje više od jednog prijelaznog stanja. Obje katalitičke konformacije dijele isto aktivno mjesto koje se stoga između dva reakcijska koraka mora strukturno mijenjati da bi uspješno akomodiralo dva različita skupa reaktanata i produkata³⁷. Ovakvo osciliranje (eng. *toggling*) aktivnog mjesta ide u prilog teoriji o reverzibilnosti svih reakcija prekrajanja, uključujući sastavljanje kompleksa i katalizu²⁴. Pokazano je da omča koja nastaje u prvoj reakciji izlazi iz aktivnog mjesta i da se kompleks preuređuje tako da se u aktivno mjesto može vezati 3'-SS, dok 5'-SS ostaje vezan između dva reakcijska koraka. Strukturne promjene kataliziraju enzimi iz skupine RNA-helikaza s DExD/H slijedom, a kod čovjeka sudjeluju i peptidil-prolil-cis/trans izomeraze⁸. Prilikom prelaska iz kompleksa B* u kompleks C dolazi i do kompozicijskih promjena uslijed disocijacije nekih vezanih i asocijacije novih proteina, ali su one puno manjeg obima nego tijekom aktivacije kompleksa⁷. Tri od pet faktora drugog katalitičkog koraka, Prp22, Slu7 i Prp18, specifični su za kompleks C, dok je Prp17 vezan već u sklopu B^{act}, a Prp16 se tek prijelazno asocira s kompleksom za prekrajanje. Proteini Cwc23 i Cwc25, čija je funkcija nejasna, te helikaza Prp43, zajedno s Ntr1 i Ntr2 s kojima formira NTR (eng. *NTC related*) kompleks uključen u razdvajanje komponenti kompleksa za prekrajanje, također se svi asociraju u ovom koraku.

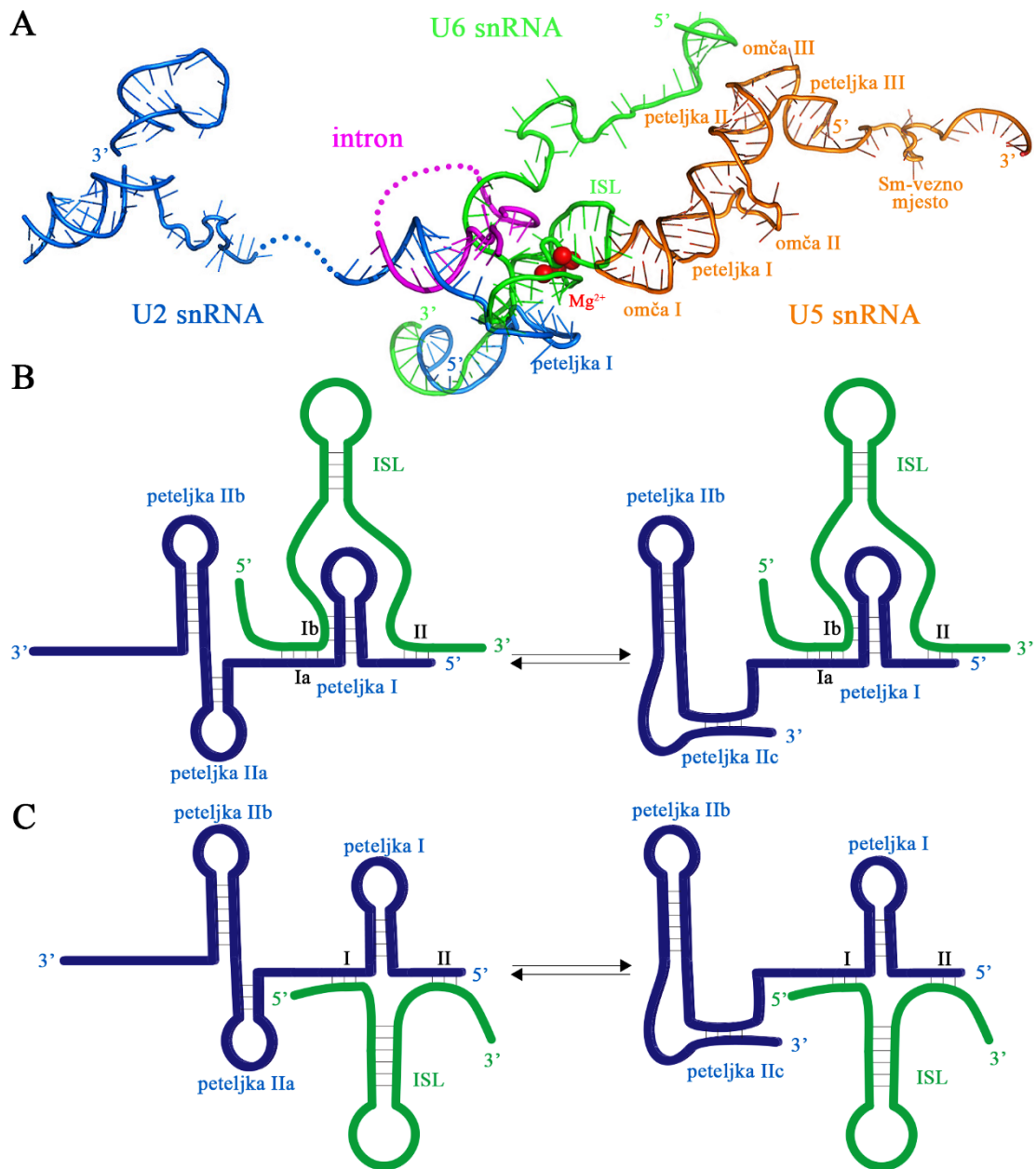
5.2 Katalitička uloga RNA

Istraživanja strukture i aktivnosti kompleksa za prekrajanje dugo nisu mogla ponuditi jasan odgovor na pitanje jesu li proteini ti koji kataliziraju reakcije prekrajanja, ili je kompleks ribozim. Najočitim kandidatom za katalitički aktivnu komponentu kompleksa smatran je centralno smješteni i evolucijski dobro očuvani protein Prp8. S druge strane, prvi čvrsti argumenti u prilog RNA kao katalitičkih molekula dobiveni su eksperimentima u kojima je pokazano da *in vitro* ribonukleotidni sustavi koji ne sadrže proteine mogu katalizirati reakcije nalik prekrajanju pre-mRNA molekula³⁸. U jednom takvom eksperimentalnom postavu *in vitro* sintetizirane U2 snRNA i U6 snRNA formirale su dvostruku uzvojnica, a kad im je dodan kratki oligonukleotid koji je sadržavao očuvani slijed s mjestom grananja, u prisustvu Mg^{2+} , katalizirale su reakciju kojom je nastala nova RNA, nazvana RNA X. Ova nova RNA ima kovalentnu vezu između 2'-OH skupine riboze isturenog adenzina u oligonukleotidu i jednog od fosfata u sklopu katalitički važne AGC trijade U6 snRNA. Formirana kovalentna veza veoma je nalik vezi koja nastaje u omčastom intermedijeru reakcije koju katalizira kompleks za prekrajanje, s tom razlikom što ne dolazi do oslobađanja 5'-kraja molekule RNA, već je u *in vitro* postavu odlazna skupina voda. U drugom eksperimentu je na 5'-kraj U6 snRNA dodan kratak RNA slijed s 5'-SS. Takva U6 ponovno se komplemetarno sparila s U2, a nastala dvostruka uzvojnica inkubirana je uz Mg^{2+} s oligonukleotidom koji sadrži mjesto grananja, pri čemu je došlo do formiranja nove RNA Y. Ovu molekulu čini U6 RNA, ali bez 5'-SS, i oligonukleotid, kovalentno povezan s njom preko izbočenog adenzina. 5'-SS slijed je s U6 RNA vjerojatno uklonjen na isti način kao što se u prvom koraku reakcije prekrajanja oslobađa 5'-ekson. Iako neki autori smatraju ovakve minimalne, *protein-free* modelne sustave nerelevantnima za razumijevanje reakcija koje katalizira kompleks za prekrajanje, oni ipak predstavljaju prve značajne indikatore ribozimske prirode kompleksa. Osim što je pokazano da postoji strukturna sličnost opisanih *in vitro* RNA sustava i kompleksa za prekrajanje, potvrđeno je i da takve RNA mogu koordinirati katalitičke metalne ione. Određenim je biokemijskim eksperimentima moguće identificirati metalne ione i pripisati im funkcije u katalizi, te definirati njihove ligande, bilo da su to proteini ili RNA. Postupak, koji se sugestivno naziva spašavanje metalnim ionom (eng. *metal ion rescue*), uključuje supstitucije atoma kisika sumporom na različitim pozicijama u blizini pretpostavljanog katalitičkog centra u kojem je koordiniran metalni ion, pri čemu dolazi do gubitka koordinacije, jer je sumpor slabiji nukleofil od kisika, ali ju je moguće ponovno uspostaviti u prisustvu tiofilnijih metalnih iona, poput Mn ili Cd. Vodeći se ovom logikom, znanstvenici su napravili niz različitih supstitucija u U6 snRNA

kvasca, u prisustvu različitih metalnih iona, te su ustvrdili da supstitucije na kritičnim pozicijama inaktiviraju U2/U6 dvostruku uzvojnica u prisustvu magnezija, dok uz mangan ili kadmij dolazi do povrata katalitičke aktivnosti¹⁶. Genetički eksperimenti također su potvrdili ono što je utvrđeno strukturnim i biokemijskim analizama. Mutacije pretpostavljenih katalitičkih proteinskih domena, prvenstveno u sklopu Prp8, koje nisu imale utjecaj na aktivnost kompleksa za prekrajanje došle su kao konačna potvrda ribozimske prirode kompleksa³⁷.

5.3 RNA-RNA interakcije

Katalitički aktivan kompleks za prekrajanje, zajedno sa snRNP proteinima i proteinskim faktorima, čine četiri različite molekule RNA– U2, U5 i U6 snRNA i pre-mRNA (Sl. 7). Intermolekulskim sparivanjem komplementarnih sljedova među njima se uspostavlja složena mreža interakcija³⁴. U5 snRNA najdublje je „zakopana“ u unutrašnjost kompleksa za prekrajanje. Najveći dio U5 snRNA tvori dvostruku zavojnicu, osim u područjima triju omči (eng. *Loop* I, II, III) koje su međusobno odvojene regijama peteljki (eng. *Stem* I, II, III)³⁴. U2 snRNA blizu svog 3'-kraja formira nekoliko intramolekulskih dvostrukih uzvojnica, jedan slijed u središnjem dijelu komplementarno se sparuje s regijom introna koja sadrži BPS, a dio je, kao i sam 5'-kraj U2 snRNA, komplementarno povezan sa sljedovima u U6 snRNA (Sl. 7A). Smatra se da je U2 snRNA izrazito dinamična tijekom katalize i da iterativno prelazi (eng. *toggling*) između dvije strukture koje se međusobno razlikuju u području intramolekulskih peteljki^{6,23,39}. Obje strukture imaju identične peteljke I i IIb, no jedna usto sadrži peteljku IIa, a druga IIc (Sl. 7B i 7C). Struktura s formiranom peteljkom IIa stimulira interakcije U2 snRNA s BPS i formiranje kompleksa za prekrajanje, dok prelazak u konformaciju s IIc inhibira ove interakcije i potiče prvi katalitički korak. Za drugi katalitički korak nužno je da U2 snRNA ponovno poprimi strukturu u kojoj je formirana peteljka IIa. Povećanje koncentracije Mg^{2+} i vezanje proteina Cus2 koordinirano utječu na strukturnu dinamiku U2 snRNA³⁹. Ioni Mg^{2+} stabiliziraju peteljku IIa i sprječavaju formiranje peteljke IIc, a isti efekt ima i Cus2 koji uspostavlja relativno slabe interakcije s U2 snRNA. Cus2 se može vezati i na IIc i na IIa, pri čemu vezanje na IIc potiče prelazak u IIa. Prijelaz između dviju konformacija događa se spontano, bez djelovanja ATP-ovisnih helikaza³⁹. U6 snRNA formira dvije intramolekulske dvostruke uzvojnice, jednu na samom 5'-kraju, a drugu, intramolekularnu petlju (ISL, *intramolecular stem-loop*) blizu 3'-kraja. Potonja koordinira katalitički bitne Mg^{2+} ione. Osim toga, U6 snRNA ima više sljedova koji se, kako je već spomenuto, komplementarno povezuju s U2 snRNA.



Slika 7. Struktura molekula RNA u katalitički aktivnom kompleksu za prekrajanje. A) Tercijarna struktura i prostorni raspored molekula RNA u aktiviranom kompleksu za prekrajanje, s označenim ključnim strukturnim elementima. Prilagođeno prema ³⁴. B) i C) Sekundarna struktura U2 i U6 snRNA u katalitičkom centru kompleksa. U2 snRNA iterativno prelazi između dvije strukture sa zajedničkim peteljčkama I i IIb, jedna od kojih usto ima formiranu peteljku IIa (lijevo), a druga IIc (desno). Interakcije između U2 i U6 opisuju dva alternativna modela prema kojima B) ove dvije molekule međusobno tvore tri dvostruke uzvojnice (Ia, Ib i II) ili C) između njih nastaje križanje četiriju dvostrukih uzvojnica (I, II, ISL, peteljka I). U2 snRNA (plavo), U4 snRNA (narančasto), U6 snRNA (zeleno), intron (ljubičasto), Mg²⁺ (crveno).

Trenutno postoje dva modela koji objašnjavaju dinamične interakcije U2 i U6 snRNA⁶. Prema starijem modelu, temeljenom na rezultatima genetičkih eksperimenata u stanicama kvasca, ove dvije RNA na tri mjesta se komplementarno povezuju i tvore dvostruke zavojnice Ia, Ib i II (Sl. 7B). Oligonukleotidni slijedovi na samom 5'-kraju U2 snRNA i na 3'-kraju U6 snRNA formiraju zavojnicu II; zavojnicu Ib čini očuvana AGC trijada U6 snRNA i komplementarni

slijed U2 snRNA, a tripleti u neposrednoj blizini komplementarno se povezuju u zavojnica Ia. Prema alternativnom modelu, postavljenom na temelju analiza kompleksa za prekrajanje u stanicama sisavaca, AGC trijada se sparuje s komplementarnim slijedom U6 snRNA i dio je produžene ISL petlje, a intramolekulska petlja stvara se i u U2, pa u konačnici nastaje križanje četiriju dvostrukih uzvojnica (eng. *four-helix junction*) (Sl. 7C). Kasnije je pokazano da i sparivanja U2 i U6 snRNA u stanicama kvasca odgovaraju ovom modelu⁴⁰. Smatra se kako je zavojnica I važna struktura za oba katalitička koraka, ali se rastavlja nakon prvog i ponovno sastavlja prije drugog koraka.

5.4 Struktura katalitičkog centra

Katalitički centar kompleksa za prekrajanje djelomično je izložen otapalu, a intron u obliku omče koji može biti različite duljine smješten je na površini, kao i dvostruke uzvojnice U2/U6 snRNA. Veći dio U5 snRNP-a čini bazu, dok su glavni katalitički elementi u središnjem dijelu, a uključuju zavojnica I U2/U6 snRNA, ISL U6 snRNA i petlju I U5 snRNA⁹. Osobita karakteristika katalitičkog centra je trolančana struktura koja nastaje povezivanjem U6 snRNA iz zavojnice Ib (trijada AGC) s još tri nukleotida U6 snRNA. Očuvani ACAGAG slijed U6 snRNA, komplementarno povezan s 5'-SS pre-mRNA, neposredno prethodi nukleotidima uključenima u ovu trolančanu strukturu. Na taj se način 5'-SS dovodi u blizinu katalitičkog centra, a već je ranije spomenuto i da se drugi ključan slijed pre-mRNA, BPS, komplementarnim povezivanjem s U2 snRNA pozicionira i aktivira za prvi korak reakcije³⁴. Katalitički magnezijevi ioni M1 i M2 koordinirani su fosfatnim skupinama nukleotida iz ISL i zavojnice Ib. Osim njih u reakciji sudjeluju još minimalno dva Mg²⁺ iona koji neutraliziraju negativne naboje na fosfatima blisko smještenih RNA molekula i na taj način stabiliziraju konformaciju aktivnog mjesta³⁴.

5.5 Uloga proteina u katalizi

Proteini koji dolaze u sastavu katalitički aktivnog kompleksa za prekrajanje mogu se generalno podijeliti na one koji imaju enzimsku aktivnost, a tu spadaju RNA-helikaze/ATPaze koje imaju slične funkcije kao i tijekom sklapanja i aktivacije kompleksa, i na strukturne proteine, čija je funkcija usmjeravanje i pozicioniranje ključnih elemenata RNA molekula u katalitičkom centru³⁴. Katalitički centar kompleksa za prekrajanje smješten je u pozitivno nabijenoj šupljini u Prp8, a iznad centralno smještenih RNA molekula dolazi potporna mreža koju čine međusobno povezane komponente kompleksa RES, NTC (Prp19/CDC5), NTR i drugi s njima asocirani proteini^{9,34}.

RES. Kompleks RES (eng. *retention-and-splicing*) važan je faktor prekrajanja koji stupa u interakciju s pre-mRNA na 3'-kraju introna neposredno prije prve transesterifikacijske reakcije, tj. prije prvog katalitičkog koraka u reakcijama prekrajanja, a osim što sudjeluje u prekrajanju, kontrolira i zadržavanje nezrele pre-mRNA u jezgri¹¹. Nije sasvim jasno koji je motiv u strukturi pre-mRNA ključan za njegovo vezanje, no pretpostavlja se da je slijed 5'-SS s manjim afinitetom za komponente kompleksa za prekrajanje zajednička karakteristika introna u čijem izrezivanju sudjeluje RES. RES je heterotrimerni proteinski kompleks (Pml1, Bud13, Snu17), molekulske mase 71 kDa, a za ovaj kompleks specifičan je izuzetno visok udio strukturno neuređenih regija – čak 80.6 %¹⁰. Tako je i središnji protein Snu17 neuređen pa mu izoliranom nije moguće odrediti trodimenzionalnu strukturu, no stabiliziraju ga interakcije s bilo kojim od druga dva proteina RES kompleksa. Uspostavljanje interakcija između sva tri proteina dodatno stabilizira kompleks, a njihovo vezanje je kooperativno. Snu17 je medijator između Pml1 i Bud,13 koji međusobno nisu u direktnom kontaktu, te je stoga i odgovoran za kooperativnost vezanja¹¹.

NTC. Prvotno je definiran kod kvasca *S. cerevisiae* kao kompleks od osam proteina koji mogu komplementirati mutacije u genu za Prp19 (eng. *Nineteen complex*). To su, uz Prp19, još i Cef1, Syf1, Syf2, Syf3, Snt309, Isy1 i Ntc20. S vremenom je identificirano 18 dodatnih NTC-asociranih faktora koji su u interakciji sa srži NTC-a u pojedinim fazama ciklusa. Kod čovjeka postoji funkcionalno ekvivalentan kompleks Prp19/CDC5 koji sadrži sličan skup proteina^{36,41}. Na osnovi rezultata dobivenih imunoprecipitacijskim eksperimentima dugo se smatralo da se NTC asocira s kompleksom za prekrajanje istovremeno ili neposredno nakon disocijacije U4 snRNA, no masenom je spektrometrijom pokazano kako je većina komponenti prisutna već u sastavu kompleksa B, iako se u kasnijim stadijima ciklusa njihova brojnost značajno poveća⁷. Proteini NTC-a stabiliziraju U5 i U6 snRNA u aktiviranom kompleksu, ostaju vezani tijekom oba reakcijska koraka, a neke komponente NTC-a ostaju asocirane s izrezanim intronom i nakon rastavljanja kompleksa. NTC je također uključen u provjeru i osiguravanje točnosti prekrajanja, a neke komponente kompleksa imaju uloge i u drugim staničnim procesima, poput regulacije staničnog ciklusa, popravka DNA, održavanja strukture citoskeleta i vezikularnog transporta⁴¹. Centralni protein ovog kompleksa, Prp19, u monomernom obliku ima tri velike domene: N-terminalnu ubikvitinsku (eng. *U-box*) domenu, središnju superzavijenu (eng. *coiled-coil*) domenu i C-terminalnu domenu koja ima strukturu β -propelera, odnosno sadrži WD40 ponavljanja^{36,41}. Eksperimentima *in vitro* je pokazano da N-terminalna domena može ubikvitinirati druge molekule⁴¹ pa je stoga moguće da Prp19 na ovaj način regulira aktivnost

kompleksa za prekrajanje⁴. Superzavijene domene dvaju Prp19 monomera međusobno se isprepleću, a tako formirani dimeri onda se povezuju u području svojih ubikvitinacijskih domena. Nastali tetramer doprinosi značajnoj konformacijskoj fleksibilnost kompleksa za prekrajanje, a osigurava i veliku površinu dostupnu za interakcije s drugim faktorima⁹. Na superzavijene se dijelove veže sržni NTC protein Cef1, a s WD domenama interagira NTC-asocirani Cwc2³⁶. Interakcije Prp19 s asociranim faktorima modulira Snt309 (Cwf7). S druge strane, za konformacijsku plastičnost kompleksa odgovorni su Syf1 i Syf3 (Cwf3, odnosno Cwf4 kod kvasca *S. pombe*), proteini s HAT ponavljajućim motivima koji su slični TPR ponavljanjima (eng. *Half A TPR*) i česti u strukturi RNA procesirajućih enzima⁹. Bitnu ulogu ima i Cef1 (Cdc5 kod kvasca *S. pombe*, a CDC5L kod ljudi) koji stabilizira konformaciju kompleksa aktiviranog za drugi reakcijski korak, a kod *S. pombe* je pokazano da Cdc5 usto može vezati dvolančanu RNA *in vitro*, što sugerira da ovaj protein izravno povezuje NTC s molekulama RNA u aktivnom mjestu kompleksa za prekrajanje³⁶.

Prp16. Još jedan protein iz skupine DExD/H helikaza, Prp16 ima ključnu ulogu prilikom prijelaza iz kompleksa B*, koji katalizira prvi korak, u kompleks C, koja katalizira drugi korak reakcije prekrajanja^{25,26}. Ključna konformacijska promjena do koje dolazi nakon prvog katalitičkog koraka je razdvajanje U2/U6 dvostruke zavojnice I, što u aktivnom mjestu omogućuje ispravno pozicioniranje supstrata za drugi korak reakcije. Zavojnica I, koja je očuvan katalitički motiv, potom se ponovno formira. Prp16 inducira ovu konformacijsku promjenu, bilo tako što razdvaja dvostruke uzvojnice RNA molekula, kao što je poznato da čini *in vitro*, ili istiskujući proteine vezane na RNA te na taj način indirektno uzrokujući promjenu njene strukture. Osim toga Prp16 regulira asocijaciju NTC proteina Cwc25 i Yju2 s kompleksom za prekrajanje. Ova dva proteina vežu se nakon djelovanja helikaze Prp2, kad se uslijed disocijacije SF3a/b za njih stvaraju vezna mjesta visokog afiniteta²⁵. Djelovanjem Prp16 dolazi do strukturnih promjena koje reduciraju vezni afinitet za Cwc25, što uzrokuje njegovu disocijaciju, a smatra se da Prp16 na sličan način potiče i disocijaciju Yju2, iako to još nije eksperimentalno pokazano. Disocijacija Yju2 i Cwc25 nakon prvog katalitičkog koraka omogućuje stabilnu asocijaciju Slu7/ Prp18 koji potiču drugu katalitičku reakciju. Budući da je Prp16 tek prijelazno u interakciji s kompleksom za prekrajanje, da bi mogao utjecati na strukturu kompleksa, mora djelovati posredno, preko nekog drugog proteina³⁶. Glavni kandidati za medijatore su NTC proteini Isy1 i Cwc2. Ova dva proteina funkcioniraju kooperativno, a potonji je usto antagonist Prp16 jer stabilizira U2/U6 zavojnicu I. Kao i još nekoliko enzima iz ove skupine, i Prp16 ovisno o hidrolizi ATP-a provjerava točnost vezanja supstrata na način da

katalizira jednu od dvije kompetirajuće reakcije – otpuštanje vezanog neispravnog omčastog međuprodukta ili zadržavanje ispravnog međuprodukta koji je onda supstrat za drugu transesterifikacijsku reakciju^{25,26}.

5.6 Usporedba sa samoizrezujućim intronima

Struktura katalitičkog centra kompleksa za prekrajanje podsjeća na samoizrezujuće introne skupine IIB³⁴. Interakcije koje se uspostavljaju između BPS introna i U2 snRNA veoma su nalik onima u domeni IV samoizrezujućih introna – i tu se pojavljuje izbočena baza A i katalitička trijada, iako ne AGC kao u kompleksu za prekrajanje, već GAG. Ova skupina introna također formira trolančanu strukturu sličnu onoj koja nastaje u aktivnom mjestu kompleksa za prekrajanje, a sadrži i slično pozicionirane Mg²⁺ ione, iako su koordinirani drugim nukleotidima. Konačno, i ovi introni se izrezuju u obliku omče, baš kao i introni koje procesira kompleks za prekrajanje, što ukazuje na zajednički reakcijski mehanizam. Sva ova opažanja upućuju na mogućnost da su se dva sustava za izrezivanje introna razvila konvergentnom evolucijom, no sličnosti u mehanizmu same reakcije izrezivanja indikatori su mogućeg zajedničkog evolucijskog porijekla.

6. RASTAVLJANJE KOMPLEKSA

Budući da se kompleks za prekrajanje na svakom intronu mora iznova sastaviti, od iznimne je stoga važnosti da se komponente kompleksa po završetku reakcije rastave i recikliraju. I u ovoj fazi ciklusa ključnu ulogu imaju dvije helikaze/ATPaze iz skupine proteina s DExD/H slijedom – Prp22 katalizira otpuštanje zrele mRNA s kompleksa P, a Prp43 katalizira otpuštanje izrezanog introna s kompleksa ISL i disocijaciju U2, U5 i U6. Kod kvasca su još za ovaj posljednji korak potrebni proteini Ntr1 i Ntr2 koji zajedno s Prp43 tvore NTR kompleks. Brr2 i Snu114, koji sudjeluju u odvijanju U4/U6 prilikom aktivacije kompleksa za prekrajanje, uključeni su i u njegovo rastavljanje jer kataliziraju razdvajanje U2/U6 dupleksa⁶.

Prp22. Helikaza Prp22 sudjeluje u drugom katalitičkom koraku reakcije prekrajanja. Iako se prije smatralo da je aktivnost Prp22 nužna za ovaj korak, ispostavilo se da enzim nije neophodan za samu reakciju, nego za otpuštanje proteina U5 snRNP-a i zrele mRNA s postkatalitičkog kompleksa P^{25,26}. Prp22 se veže na mRNA u području introna te se uz hidrolizu ATP-a translocira od mjesta spajanja eksona. *In vitro* je pokazano da enzim ima 3'-5' helikaznu aktivnost za koju se smatra da mu omogućava izravno razdvajanje U5 snRNA i mRNA, a osim toga je genetičkim eksperimentima pokazano da Prp22 narušava i interakcije koje stabilizira Prp8, kako između molekula RNA, tako i između RNA i proteina. Kao i još neki od proteina iz ove skupine, i Prp22 koristi hidrolizu ATP-a kao mehanizam provjere točnosti prekrajanja, suzbijajući odvijanje reakcije ako je s kompleksom vezan neispravan intermedijer⁵.

Prp43. ATPazna aktivnost Prp43 ključna je za rastavljanje kompleksa za prekrajanje RNA^{25,26}. Prp43 ima dva kofaktora, Ntr1 (Spp382) i Ntr2. Heterodimer Ntr1-Ntr2 zajedno s vezanim Prp43 formira aktivirani NTR kompleks. Ntr1 je u izravnoj interakciji s Prp43 te stimulira njegovu helikaznu aktivnost, dok Ntr2 omogućava vezanje NTR na kompleks za prekrajanje tako što uspostavlja interakcije s komponentom U5 snRNP-a, helikazom Brr2. Osim što potiče disocijaciju komponenti kompleksa nakon dovršetka reakcije prekrajanja, Prp43 je odgovoran i za rastavljanje neispravnih intermedijera koji su vezali suboptimalne supstrate, no samo oni kompleksi na koje su djelovali enzimi Prp2 i Prp16 podložni su i djelovanju Prp43. Osim što sudjeluje u reakcijama kompleksa za prekrajanje, Prp43 ima uloge u procesiranju rRNA i biogenezi ribosoma²⁶.

7. REGULACIJA

Reakcije prekrajanje najizraženije su modulirane na razini sklapanja kompleksa, iako uzevši u obzir različito mnoštvo pre-mRNA supstrata i faktora uključenih u njihovo prekrajanje, i bilo koji od brojnih koraka koji slijede može biti na ovaj način efikasno reguliran.

7.1 Posttranslacijske modifikacije

Brojni proteini koji u različitim fazama ciklusa ulaze u sastav kompleksa za prekrajanje posttranslacijski su na neki način modificirani, a utvrđeno je da mnoge od tih modifikacija imaju važne regulacijske uloge u procesu prekrajanja. Fosforilacija i ubikvitinacija najzastupljenije su i najdinamičnije posttranslacijske modifikacije. Proteomičkim je analizama pokazano još i da su brojni proteini kompleksa za prekrajanje acetilirani, kao i da inhibitori acetilacije blokiraju sklapanje kompleksa *in vitro*, što ukazuje na bitnu ulogu ovih modifikacija. Protein U2AF65 je lizil-hidroksiliran, a enzim koji katalizira ovu modifikaciju, Jmjd6, također je bitan u regulaciji prekrajanja⁶.

Fosforilacija. Fosforilacija proteina važan je regulacijski mehanizam prilikom sklapanja kompleksa, kao i prilikom katalize. Poznate su četiri kinaze koje fosforiliraju proteine kompleksa za prekrajanje kod ljudi – kinaze SR proteina 1 i 2 (SRPK1 i SRPK2), Prp4 kinaza i Clk/Sty kinaza⁸. Fosforilacija ima ključnu ulogu u regulaciji uključivanja tri-snRNP-a u kompleks B. Kod ljudi se hPrp28 fosforilira djelovanjem SRPK2, a Prp4-kinaza fosforilira tri-snRNP proteine Prp6 i Prp31, dok kod kvasca nisu pronađeni analozi SRPK2 ni Prp4-kinaze. Općenito se tijekom ciklusa prekrajanja kod kvasca događa puno manje dinamičkih fosforilacija i defosforilacija te stoga postoji manje potencijalnih regulacijskih točaka, što je u skladu s izostankom alternativnog prekrajanja⁶. Fosforilacije i defosforilacije proteina imaju važne uloge i tijekom katalitičkih reakcija ciklusa. Defosforilacija U1-70K i SR proteina ASF/SF2 nužna je za prvi reakcijski korak kod sisavaca. U2-asocirani protein SF3b155 hiperfosforilira se neposredno prije ili tijekom prvog koraka, a isti protein i U5-116K (Snu114) defosforiliraju se tijekom drugog koraka, djelovanjem PP1 odnosno PP2A fosfataza^{6,38}. Bioinformatička su istraživanja pokazala da mjesta dinamične fosforilacije dolaze u regijama proteina koje izravno stupaju u intermolekulske interakcije, što ukazuje da su ove modifikacije bitne za regulaciju jačine vezanja i interakcija između proteina⁴. Čak oko jedne trećine svih Ser/Thr/Tyr u dodirnim regijama je fosforilirano. Tirozin je najčešće fosforilirano u uređenim regijama proteina, dok je fosforilacija serina najčešća u neuređenim regijama. Kao što je već

spomenuto, neuređeni proteini osiguravaju izuzetnu plastičnost potrebnu za funkcioniranje kompleksa za prekrajanje. Konformacijska fleksibilnost omogućava ovim proteinima ostvarivanje mnogobrojnih interakcija s raznolikim partnerima, a afiniteti kojima vežu različite supstrate redovito su regulirani posttranslacijskim modifikacijama. Primjerice, u području neuređene regije ranije spomenutog SF3b155 vežu se drugi proteinski faktori i induciraju različite strukturne promjene, ovisno o fosforilacijskom statusu specifičnih treonin-prolin motiva u neuređenoj regiji⁸.

Ubikvitinacija. Pokazano je da je ubikvitinacija ključna za održavanje razine tri-snRNP kompleksa jer sprječava prerano razdvajanje U4/U6 di-snRNP-a. U ciklusu reverzibilne poliubikvitinacije sudjeluju proteini Prp3 i Prp19 koji se ubikvitiniraju ili deubikvitiraju, deubikvitinacijski enzim Usp4 i protein Prp24/Sart3 kojeg ovaj enzim veže, te Prp8 koji ima ubikvitin-vezujuću domenu, a pokazano je da je u sklopu pročišćenog tri-snRNP-a i sam ubikvitiniran⁴. Pretpostavlja se da ova modifikacija stabilizira njegove interakcije s drugim proteinima te da modulira njegovu sposobnost aktivacije helikaze Brr2^{6,38}. Na samom početku ubikvitinacijskog ciklusa Prp19 autokatalitički sam sebe ubikvitinira. Kad Prp19/CDC5 kompleks (NTC) stupa u interakciju s U4/U6 di-snRNP-om, Prp19 prenosi vlastite ubikvitinske lance na Prp3, čime se povećava afinitet Prp3 za Prp8 koji ima ubikvitin-vezujuću domenu. Interakcija Prp3, u sklopu s U4/U6 di-snRNP-a, i Prp8, koji je dio U5 snRNP-a, omogućava sastavljanje U4/U6.U5 tri-snRNP-a, a Prp8 usto aktivira ključni enzim u ovom koraku ciklusa, helikazu Brr2. Jednom kad se U4/U6.U5 tri-snRNP uključi u sastav kompleksa za prekrajanje, Usp4 deubikvitinira Prp3, smanjujući njegov afinitet za Prp8. Ovo potiče disocijaciju U4 snRNP-a, omogućavajući istovremeno uspostavljanje interakcija U6 snRNA sa U2 snRNA i formiranje katalitičkog centra. U4 snRNP nije više vezan u kompleksu za prekrajanje pa može doći do komplementarnog sparivanja U4/U6 snRNA, što katalizira Prp24/Sart3 kroz vlastitu seriju strukturnih prijelaza. Kad se formira U4/U6 di-snRNP, Prp3 u njegovom sastavu može ponovno biti ubikvitiniran od strane Prp19 kako bi došlo do formiranja U4/U6.U5 tri-snRNP-a koji onda sudjeluje u novom ciklusu kompleksa za prekrajanje⁴. Ubikvitinacije proteina funkcioniraju koordinirano s ranije opisanim fosforilacijama Prp6, Prp28 i Prp31, te obje vrste postranslacijskih modifikacija zajedno reguliraju formiranje tri-snRNP-a i sastavljanje kompleksa B.

7.2 Kinetički model provjere točnosti

Osim što kataliziraju većinu najvažnijih konformacijskih promjena kompleksa za prekrajanje, RNA-helikaze/ATPaze iz DExD/H skupine imaju važnu ulogu i u osiguravanju točnosti reakcija prekrajanja. Brzina hidrolize ATP-a od strane nekih od ovih enzima određuje sudbinu njihovih supstrata, intermedijera u ciklusu prekrajanja pa stoga i konačan ishod reakcija prekrajanja, a model koji to objašnjava naziva se kinetičkim modelom i baziran je na pretpostavki o uspostavljanju ravnoteže između odbacivanja i procesiranja vezanog supstrata⁵. Aktivacija ATPazne aktivnosti helikaze ograničava vrijeme u kojem može doći do uspostavljanja interakcija između supstrata i enzima. Kako se vezanje ispravnog supstrata, koji s enzimom ostvaruje optimalan broj interakcija, odvija brzo, ATPaza se aktivira tek nakon što se uspostavi asocijacija enzima i supstrata, i tada dodatno stabilizira njihove interakcije. S druge strane, vezanje neispravnog ili mutiranog supstrata odvija se sporije i u tom slučaju aktivacija ATPaze dovodi do odbacivanja supstrata i rastavljanja kompleksa. Stoga DExD/H helikaze/ATPaze imaju dvojaku funkciju – mogu stabilizirati ispravne i destabilizirati neispravne interakcije²⁶. Ovakav mehanizam provjere točnosti prvotno je opisan u procesu translacije, a kasnije je ustanovljeno da i u ciklusu kompleksa za prekrajanje RNA dolazi na nekoliko mjesta. Prilikom sklapanja kompleksa helikaza Prp5 provjerava ispravnost nukleotidnog slijeda u mjestu grananja, a Prp28 provjerava zamjenu U1 snRNA, komplementarno vezane na 5'-SS, sa U6 snRNA. Prp16 provjerava interakcije 5'-SS i BS, a Prp22 interakcije 3'-SS i BS tijekom katalitičkih reakcija prekrajanja^{25,26}. Primjerice, ako je u aktivno mjesto kompleksa za prekrajanje vezan ispravan slijed pre-mRNA, prva transesterifikacijska reakcija odvija se brže nego hidroliza ATP-a i konformacijska promjena koja bi rezultirala otpuštanjem vezanog faktora Cwc25. U tom slučaju Prp16 otpušta Cwc25 tek po završetku prvog katalitičkog koraka, i tada se oslobodi mjesto za vezanje faktora koji kataliziraju drugi korak reakcije. U slučaju vezanja pogrešnog ili mutiranog supstrata, hidroliza ATP-a brža je od transesterifikacijske reakcije, što uzrokuje otpuštanje Yju2 i Cwc25 prije dovršetka prvog koraka i vezanje helikaze/ATPaze Prp43 koja katalizira rastavljanje kompleksa za prekrajanje³⁶.

7.3 Koordinacija s transkripcijom

Brojna istraživanja sugeriraju da se reakcije transkripcije, koje katalizira RNA-polimeraza II, i reakcije posttranskripcijske dorade primarnih transkripata mRNA, uključujući i izrezivanje introna, barem jednim dijelom događaju istovremeno. Do kotranskripcijskog prekrajanja može

doći već kad je sintetizirano 25-30 baza iza 3'-mjesto prekrajanja, odnosno kad je desetak baza prošlo kroz izlazni kanal transkripcijskog kompleksa¹⁷. Transkripcija i metabolizam RNA međusobno su integrirani prostornim i kinetičkim mehanizmima. C-terminalna domena (CTD) RNA polimeraze II glavna je fizička poveznica između ovih procesa jer na sebe veže različite proteine koji sudjeluju u reakcijama dorađivanja pre-mRNA. Interakcije koje CTD uspostavlja s različitim faktorima regulirane su fosforilacijom amnokiselinskih ostataka u heptamernim ponavljanjima (YS₂PTS₅PS) pa se govori o tzv. CTD kodu¹⁷. CTD funkcionira tako što premošćuje faktore prekrajanja vezane na 3'-SS i na 5'-SS na suprotnim krajevima svakog eksona⁴². Neki od faktora koji sudjeluju u reakcijama prekrajanja i transkripcije su TFIIIS kod kvasca i SR proteini, a zna se i da neki od faktora koji stimuliraju poliadenilaciju vežu U1 snRNP i SR proteine^{16,17}. Faktori prekrajanja ne vežu se isključivo preko CTD RNA-polimeraze II, već mogu biti i u interakciji s medijatorima vezanima na promotore i na pojačivače uzvodno od mjesta inicijacije transkripcije, što donekle objašnjava opažanja da promotorski slijedovi utječu na to kako se transkript prekraja^{17,42}. Drugi vid koordinacije procesa transkripcije i prekrajanja je na kinetičkoj razini i opisuje se modelom prioriteta prema vremenskom redoslijedu (eng. *first-come-first-served*) prema kojem uzvodna mjesta prekrajanja imaju kompetitivnu prednost u odnosu na nizvodna jednostavno stoga što se prije prepisuju, a prednost je to veća što je stopa transkripcije manja, odnosno što je transkripcija sporija¹⁷. Konačno, za razliku od drugih reakcija dorade pre-mRNA transkripta, poput dodavanja 5'-kape i poliadenilacije na 3'-kraju, koje se odvijaju isključivo kotranskripcijski, za određene je pre-mRNA transkripte ključno da do prekrajanja dolazi i posttranskripcijski^{15,16}. Prekranje dugačkih gena s velikim intronima često se niti ne može dogoditi prije nego se gen u potpunosti prepisao, a poznati su i slučajevi u kojima prvom reakcijom prekrajanja nastane dodatno mjesto koje prepoznaju komponente kompleksa za prekranje.

8. ZAKLJUČAK

Izuzetna složenost i heterogenost kompleksa za prekrajanje RNA faktori su koji limitiraju rezoluciju riješenih struktura kompleksa. Više od 200 različitih proteina sudjeluje u reakcijama prekrajanja, a njihove brojne asocijacije i disocijacije, uz opsežne konformacijske promjene kako proteina, tako i RNA, glavni su uzrok izuzetne dinamičnosti koja čini ovaj kompleks jednim od najzahtjevnijih izazova postavljenih pred znanstvenike koji proučavaju strukturu i mehanizme funkcioniranja bioloških makromolekulskih kompleksa. Velik napredak u nastojanju da se elektronskom mikroskopijom dobiju što detaljnije strukture takvih kompleksa omogućen je razvojem tehnologije i metoda obrade podataka, te primjenom tehnika označavanja (eng. *EM labeling*)¹⁴ i posebice krioelektronskom mikroskopijom (eng. *cryo-EM*)⁴³ koja je kroz nekoliko zadnjih godina revolucionirala čitavo područje strukturne biologije i gotovo u svim segmentima, od rezolucije do spektra dobivenih struktura, nadmašila sveprisutne kristalografske metode. Upravo je korištenjem krioelektronske mikroskopije nedavno po prvi put riješena struktura katalitički aktivnog kompleksa za prekrajanje, kod kvasaca *S. pombe*^{9,34} i *S. cerevisiae*³⁰, a određene su i strukture drugih konformacija koje se poprimaju u ciklusu prekrajanja kod kvasca^{13,30,32} i kod čovjeka³¹. Valja ipak imati na umu da su i nove metode ograničene jer je izolacijom uglavnom moguće dobiti jako male koncentracije kompleksa, prvenstveno zbog uvijek prisutnog problema stabilnosti velikih kompleksa prilikom izolacije, a mjesta za napredak ima i u području pripreme uzorka za mikroskopiranje, kao i u detekciji signala. Ovo će se područje stoga sigurno još razvijati, a primjena unaprijeđenih metoda i tehnika obećava još detaljniji uvid u funkcioniranje kompleksa za prekrajanje RNA. Nova saznanja i bolje razumijevanje mehanizama za posljedicu mogu imati analogne primjene u vidu ciljane modifikacije ekspresije gena manipulacijom prekrajanja primarnih transkripata mRNA.

9. LITERATURA

1. Chow, L. T., Gelinas, R. E. & Broker, T. R. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1–8 (1977).
2. Berget, S. M., Shartp, P. A. & Moore, C. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3171–5 (1977).
3. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman and Company).
4. Chen, W. & Moore, M. J. The spliceosome: disorder and dynamics defined. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 141–149 (2014).
5. Koodathingal, P. & Staley, J. P. Splicing fidelity: DEAD/H-box ATPases as molecular clocks. *RNA Biol.* **10**, 1073–1079 (2013).
6. Will, C. L. & Luhrmann, R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003707 (2011).
7. Fabrizio, P. *i sur*. The Evolutionarily Conserved Core Design of the Catalytic Activation Step of the Yeast Spliceosome. *Mol. Cell* **36**, 593–608 (2009).
8. Wahl, M. C., Will, C. L. & Lührmann, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* **136**, 701–718 (2009).
9. Yan, C. *i sur*. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science* **349**, 1182–1191 (2015).
10. Korneta, I. & Bujnicki, J. M. Intrinsic Disorder in the Human Spliceosomal Proteome. *PLOS Comput Biol* **8**, e1002641 (2012).
11. Wysoczanski, P. & Zweckstetter, M. Retention and splicing complex (RES) – the importance of cooperativity. *RNA Biol.* **13**, 128–133 (2016).
12. Stevens, S. W. *i sur*. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol. Cell* **9**, 31–44 (2002).

13. Wan, R. *i sur*. The 3.8 Å structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: Insights into spliceosome assembly and catalysis. *Science* **351**, 466–475 (2016).
14. Jurica, M. S. & Moore, M. J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* **12**, 5–14 (2003).
15. Neugebauer, K. M. On the importance of being co-transcriptional. *J. Cell Sci.* **115**, 3865–3871 (2002).
16. Lee, Y. & Rio, D. C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 291–323 (2015).
17. Saldi, T., Cortazar, M. A., Sheridan, R. M. & Bentley, D. L. Coupling of RNA Polymerase II Transcription Elongation with Pre-mRNA Splicing. *J. Mol. Biol.* **428**, 2623–35 (2016).
18. Shao, C. *i sur*. Mechanisms for U2AF to define 3' splice sites and regulate alternative splicing in the human genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 997–1005 (2014).
19. Stark, H. & Lührmann, R. Cryo-electron microscopy of spliceosomal components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 435–457 (2006).
20. van der Feltz, C., Anthony, K., Brilot, A. & Pomeranz Krummel, D. A. Architecture of the Spliceosome. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 3321–3333 (2012).
21. Kondo, Y., Oubridge, C., Roon, A.-M. M. van & Nagai, K. Crystal structure of human U1 snRNP, a small nuclear ribonucleoprotein particle, reveals the mechanism of 5' splice site recognition. *eLife* **4**, e04986 (2015).
22. Pomeranz Krummel, D. A., Oubridge, C., Leung, A. K. W., Li, J. & Nagai, K. Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* **458**, 475–480 (2009).
23. Smith, D. J., Query, C. C. & Konarska, M. M. 'Nought may endure but mutability': spliceosome dynamics and the regulation of splicing. *Mol. Cell* **30**, 657–666 (2008).

24. Matera, A. G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 108–121 (2014).
25. Liu, Y.-C. & Cheng, S.-C. Functional roles of DExD/H-box RNA helicases in Pre-mRNA splicing. *J. Biomed. Sci.* **22**, 54 (2015).
26. Cordin, O. & Beggs, J. D. RNA helicases in splicing. *RNA Biol.* **10**, 83–95 (2013).
27. Liang, W.-W. & Cheng, S.-C. A novel mechanism for Prp5 function in prespliceosome formation and proofreading the branch site sequence. *Genes Dev.* **29**, 81–93 (2015).
28. Turner, I. A., Norman, C. M., Churcher, M. J. & Newman, A. J. Roles of the U5 snRNP in spliceosome dynamics and catalysis. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 928–931 (2004).
29. Nguyen, T. H. D. *i sur*. The architecture of the spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP. *Nature* **523**, 47–52 (2015).
30. Nguyen, T. H. D. *i sur*. Cryo-EM structure of the yeast U4/U6.U5 tri-snRNP at 3.7 Å resolution. *Nature* **530**, 298–302 (2016).
31. Agafonov, D. E. *i sur*. Molecular architecture of the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *Science* **351**, 1416–1420 (2016).
32. Nguyen, T. H. D. *i sur*. CryoEM structures of two spliceosomal complexes: starter and dessert at the spliceosome feast. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **36**, 48–57 (2016).
33. Galej, W. P., Nguyen, T. H. D., Newman, A. J. & Nagai, K. Structural studies of the spliceosome: zooming into the heart of the machine. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **25**, 57–66 (2014).
34. Hang, J., Wan, R., Yan, C. & Shi, Y. Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science* **349**, 1191–1198 (2015).
35. Mozaffari-Jovin, S. *i sur*. Inhibition of RNA helicase Brr2 by the C-terminal tail of the spliceosomal protein Prp8. *Science* **341**, 80–84 (2013).

36. de Almeida, R. A. & O’Keefe, R. T. The NineTeen Complex (NTC) and NTC-associated proteins as targets for spliceosomal ATPase action during pre-mRNA splicing. *RNA Biol.* **12**, 109–114 (2015).
37. Fica, S. M. *i sur.* RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature* **503**, 229–234 (2013).
38. Wachtel, C. & Manley, J. L. Splicing of mRNA precursors: the role of RNAs and proteins in catalysis. *Mol. Biosyst.* **5**, 311–316 (2009).
39. Rodgers, M. L. *i sur.* Conformational dynamics of stem II of the U2 snRNA. *RNA N. Y. N* **22**, 225–236 (2016).
40. Sashital, D. G., Cornilescu, G., McManus, C. J., Brow, D. A. & Butcher, S. E. U2-U6 RNA folding reveals a group II intron-like domain and a four-helix junction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1237–1242 (2004).
41. Hogg, R., McGrail, J. C. & O’Keefe, R. T. The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1110–1115 (2010).
42. Cramer, P. *i sur.* Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS Lett.* **498**, 179–182 (2001).
43. Callaway, E. The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. *Nature* **525**, 172–174 (2015).

10. SAŽETAK

Eukariotski geni između kodirajućih sljedova, eksona, sadrže dugačke nekodirajuće introne. Geni se u cijelosti prepisuju u primarne transkripte mRNA, a introni se naknadno izrezuju djelovanjem multi-megadaltonskog ribonukleoproteinskog kompleksa za prekrajanje (eng. *spliceosome*). Ovaj kompleks sastavlja se postepeno u jezgri eukariotske stanice, na odgovarajućem pre-mRNA supstratu, a potom se aktivira kako bi mogao katalizirati reakcije izrezivanja introna i povezivanja eksona u zrelu molekulu mRNA. Najznačajnije karakteristike ovog kompleksa njegova su veličina (preko 3 MDa), brojnost komponenti (preko 200 proteina i 5 molekula RNA) te ribozimska i metaloenzimaska priroda. Evolucijski očuvani elementi sekundarne strukture molekula RNA u aktivnom mjestu kompleksa imaju ključne katalitičke uloge, poput koordinacije metalnih iona, dok su proteini u ciklusu prekrajanja prvenstveno odgovorni za ispravno pozicioniranje i stabilizaciju ovih struktura. Još jedna značajna karakteristika je i izuzetna plastičnost kompleksa koja je dijelom posljedica velikog broja strukturno neuređenih proteina, a koja omogućuje uspješno prepoznavanje i izrezivanje introna iz najrazličitijih transkripata pre-mRNA. Izrezivanje introna mora biti izuzetno precizno ali i brzo, kako bi se u citoplazmu iz jezgre iznosile samo ispravno dorađene mRNA molekule. Stoga su stavljanje kompleksa, aktivacija i kataliza regulirani posttranslacijskim modifikacijama i djelovanjem enzima koji uz utrošak ATP-a osiguravaju točnost ovih reakcija, a sve ključne reakcije ciklusa su reverzibilne. Prekrajanje je usto djelomično koordinirano s transkripcijom i drugim reakcijama metabolizma RNA. Nakon dovršetka reakcija prekrajanja, kompleks se rastavlja. Produkti reakcija, zrela mRNA i intron u obliku omče, jedan za drugim disociraju, kao u konačnici i komponente kompleksa koje se onda mogu uključiti u novi ciklus na drugom pre-mRNA supstratu.

11. SUMMARY

Nuclear pre-mRNA splicing is catalysed by the spliceosome, multi-megadalton ribonucleoprotein complex which is assembled in stepwise fashion and activated while bound to its substrate. Defining features of this complex are its size (over 3 MDa), myriad of components (more than 200 proteins and 5 RNAs), and the fact that it is a ribozyme, as well as a metalloenzyme. Evolutionary conserved elements in the secondary structure of RNAs carry out important catalytic functions, such as coordination of catalytic metal ions in the active site, while protein components are found to assist in formation of these secondary structures, as well as in stabilising their interactions. Another important characteristic of the spliceosome is its remarkable plasticity, which is in part due to a large number of intrinsically disordered proteins. This allows for introns from a wide range of vastly different pre-mRNA substrates to be successfully spliced. Splicing must be fast and precise at once, so as to assure that only the correctly spliced and modified RNAs are exported from nucleus to cytoplasm. To achieve this, spliceosome assembly, activation, and catalysis are highly regulated by different posttranslational modifications and through the action of the several enzymes that utilize ATP in order to maintain splicing reaction fidelity. In addition, all of the main reactions in the spliceosome cycle are reversible. Splicing is also, at least to some extent, coordinated with transcription and RNA metabolism which take place in the nucleus. Following the completion of splicing reactions, mature mRNA and intron in the form of lariat sequentially dissociate, as do the components of the spliceosome. These are then recycled in another spliceosome cycle.