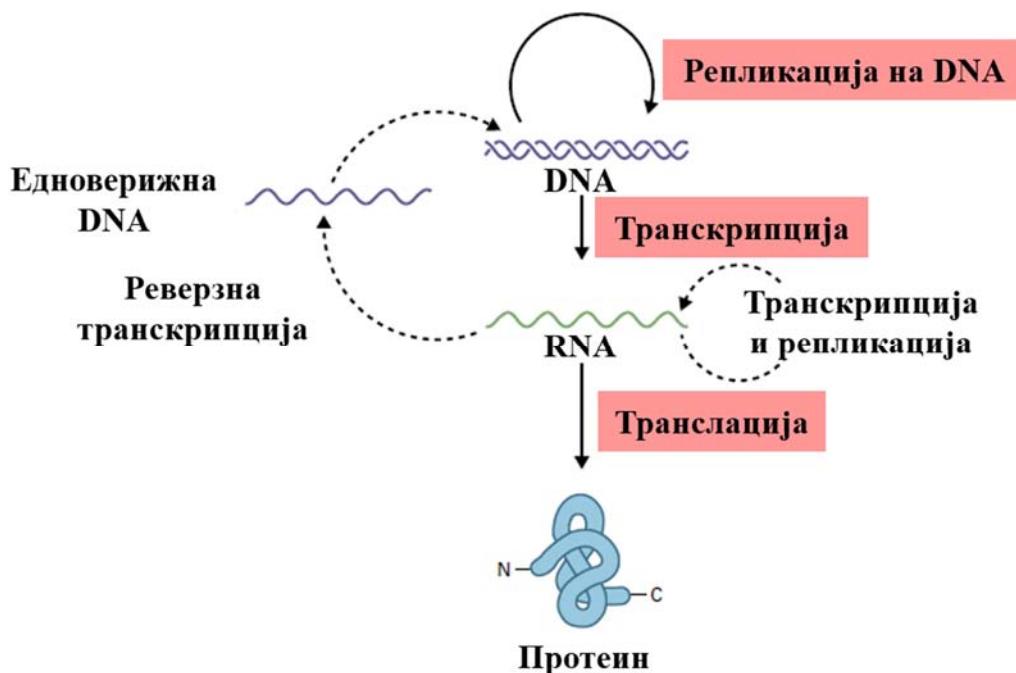


1. Нуклеински киселини

Вовед

Нуклеинските киселини, деоксирибонуклеинска киселина (DNA) и рибонуклеинска киселина (RNA) се полимерни молекули кои ја чуваат и пренесуваат генетската информација. Вкупната содржина на DNA во живите организми го сочинува **геномот** на клетката. За време на процесот на **транскрипција**, DNA-секвенците служат како урнек за синтеза на RNA-молекули. Одредени RNA-молекули претставуваат структурен матрикс во рибопотеинскиот комплекс, други RNA-молекули претставуваат регулаторни молекули за генска експресија, додека пак, информациските RNA-молекули (mRNA) се декодираат од рибозомите за време на процесот на **транслација**. Информацијата во преведената секвенца на mRNA ја одредува аминокиселинската секвенца на протеините, која значајно влијае врз фенотипските карактеристики на организмите. При делба на клетките, **репликацијата** на DNA овозможува формирање на дуплиран сет на генетски информации за новата клетка (Сл. 1.1). Репликацијата и репарацијата на DNA се значајни процеси во клетките бидејќи преживувањето на организмите зависи од стабилноста на геномот. Сепак, преживувањето на една популација може да се одржува преку генетски варијации кои произлегуваат од промените во копиите на DNA кај индивидуални организми.



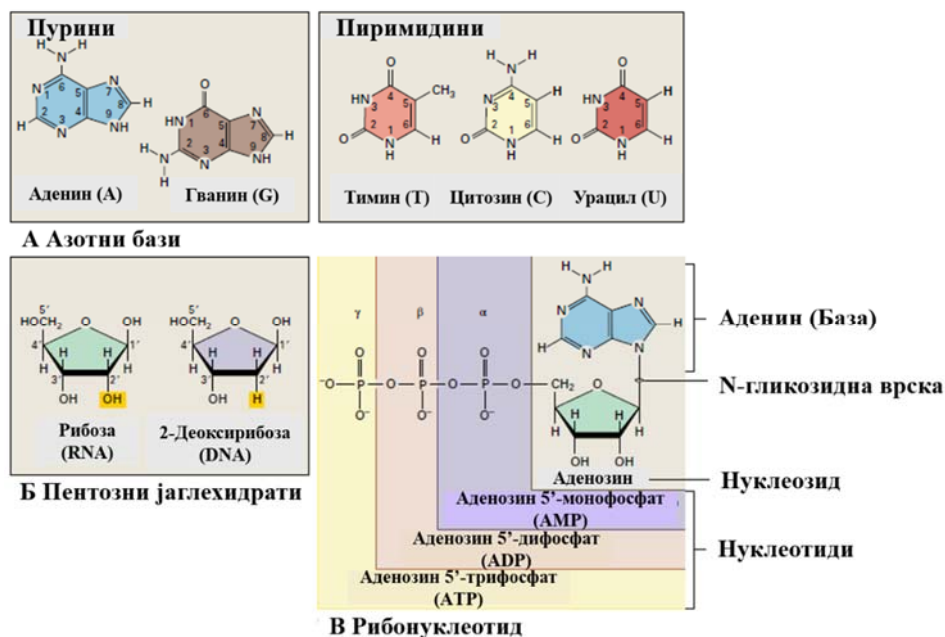
Слика 1.1 Генетската информација кај живите организми е зачувана во геномите на двојноверижни DNA-молекули. Едноверижните RNA-молекули се транскрибираат од DNA-молекулите кои служат како урнек (матрица). Некои RNA-молекули кодираат информации за синтеза на специфични протеини. Други RNA-молекули учествуваат во обработка на RNA или транслација на RNA-секвенци во протеини. Од друга страна пак, вирусните геноми се варијабилни, односно различни вируси кодираат генетска информација која е неопходна за нивна амплификација во едноверижни или двојноверижни геноми кои содржат DNA или RNA. Испрекинатите линии ги прикажуваат патиштата на репродукција на едноверижни RNA и DNA-вируси (Buchanan и сор., 2015).

Живите организми ја чуваат генетската информација во форма на двојноверижни DNA-молекули. Од друга страна пак, вирусните геноми се состојат од двојноверижни или едноверижни нуклеински киселини од DNA или RNA. Вирусите имаат мал геном кој кодира неколку протеини кои се неопходни за репликација на вирусите. Вирусите ги користат биохемиските системи на клетката-домаќин за нивно размножување и репликација на нуклеинските киселини. Така на пр., при инфекција на клетката со RNA-вирус, клетката-домаќин може да изврши транслација на вирусната RNA во протеин или може да го користи вирусниот геном како урнек за синтеза на комплементарна RNA која понатаму подлежи на процесот на транслација. Некои RNA-вируси кодираат ензим реверзна транскриптаза кој ја користи RNA како урнек за синтеза на DNA. Откако овој ензим ќе катализира реакција на реверзна транскрипција на DNA-копија од вирусниот RNA-геном, транскрипциските и транслациските процеси на клетката-домаќин учествуваат во продукција на останатите компоненти кои се неопходни за мултипликација на вирусот (Сл. 1.1).

1.1 Состав на нуклеински киселини и синтеза на нуклеотиди

1.1.1 DNA и RNA се полимери на пурински и пиримидински нуклеотиди

Молекулите на DNA и RNA се долги, неразгранети полимери составени од 4 типа на структурни единици познати како нуклеотиди. Секој нуклеотид е изграден од пуринска или пиримидинска база, пентозен јаглехидрат и фосфатна група (Сл. 1.2).



Слика 1.2 Хемиски состав на нуклеински киселини. (А) Пуринските бази аденин и гванин, како и пиримидинската база цитозин се присутни во молекулите на DNA и RNA. Пиримидинската база тимин е присутна во DNA, додека пак, урацилот го заменува тиминот во RNA. (Б) RNA-нуклеотидите содржат пентозен јаглехидрат рибоза, додека пак, DNA-нуклеотидите содржат помалку реактивен пентозен јаглехидрат 2-деоксирибоза. Кај нуклеозидите и нуклеотидите, јаглехидратите од пентозниот јаглехидрат се нумерирани од 1' до 5'. (В) Нуклеозидот е составен од пуринска или пиримидинска база и пентозен јаглехидрат. Нуклеотидот претставува нуклеозид, каде што C-5' е поврзан со една, две или три фосфатни групи со фосфоестерна врска (Buchanan и сор., 2015).

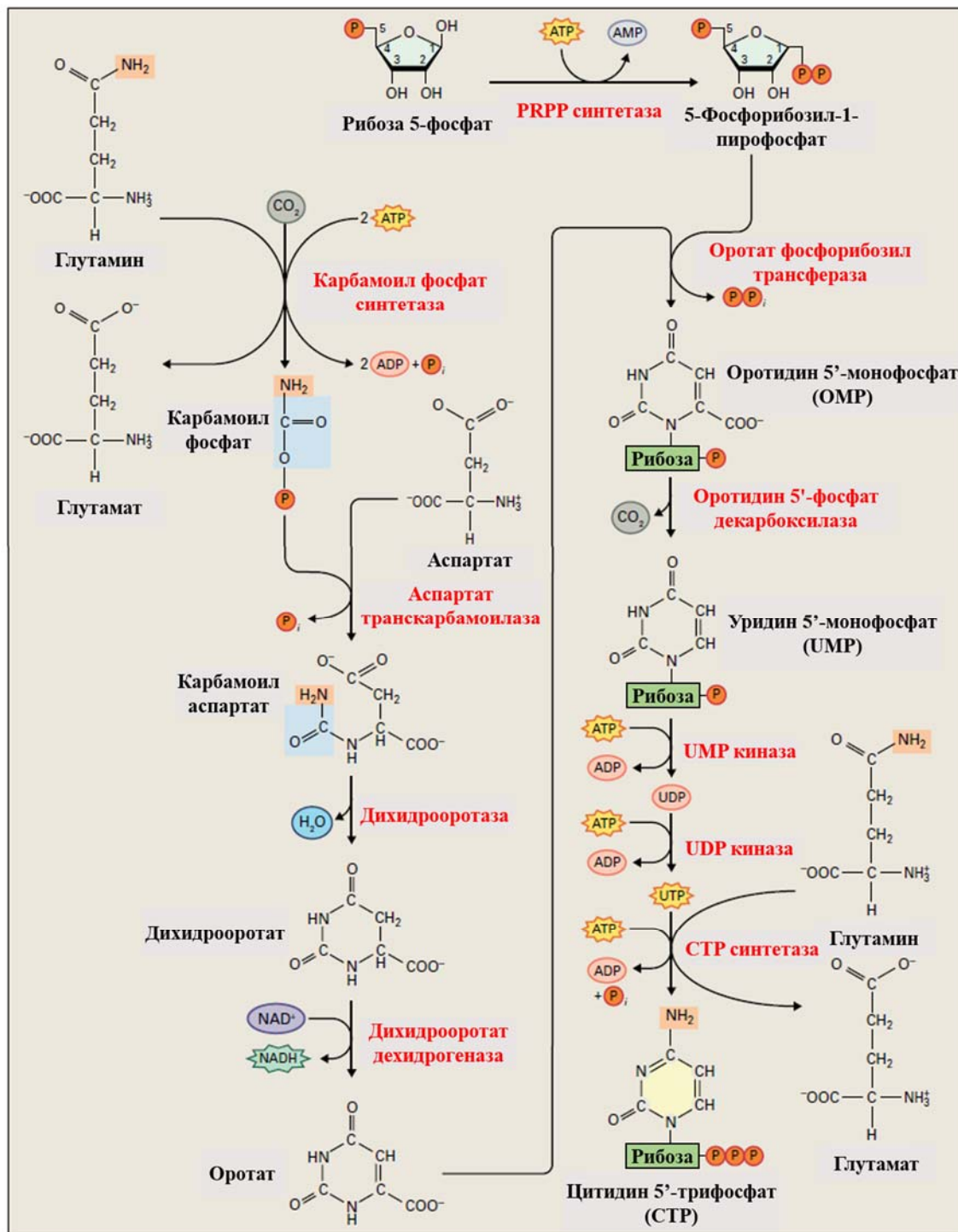
Рибонуклеотидите кај RNA-молекулите содржат рибоза, односно јаглехидрат со хемиска формула $(CH_2O)_5$. Деоксирибонуклеотидите се составен дел од DNA-молекулите и содржат 2-деоксирибоза, каде што е отстранета хидроксилната група поврзана за C-2 атомот. Молекулите на RNA се понестабилни во споредба со DNA-молекулите поради присуството на реактивни 2'-хидроксилни групи. Исто така, во структурата на нуклеинските киселини учествуваат два типа на азотни бази: пурины и пиримидини. Молекулите на DNA ги содржат пуринските бази аденин и гванин, како и пиримидинските бази цитозин и тимин. Молекулите на RNA ги содржат базите аденин, гванин и цитозин, додека пак, тиминот е заменет со друг пиримидин означен како урацил. Некои рибонуклеински киселини, особено транспортните RNA молекули (tRNA) можат да содржат некои невообичаени или модифицирани бази.

1.1.2 Синтезата на пиримидински и пурински нуклеотиди во растителните клетки се одвива *de novo*, како и преку „патишта на спасување“ (salvage pathways)

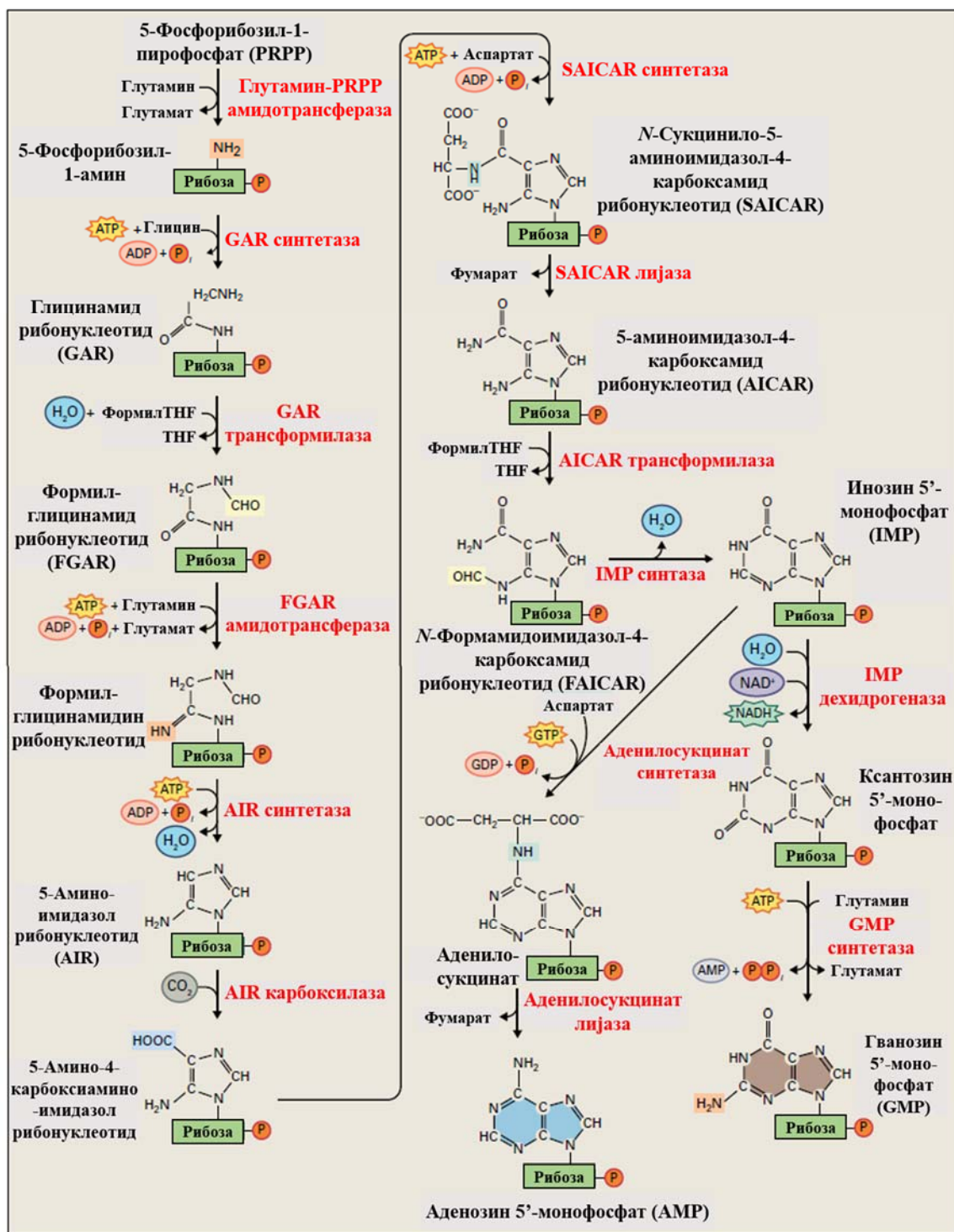
De novo синтезата на пиримидински нуклеотиди започнува со серија на реакции од патот на оротична киселина (оротат). Пиримидинот оротат се формира од CO_2 , аспартат и амидната група на глутаминот (Сл. 1.3). Формираниот оротатот се поврзува за 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP), а потоа се модифицира со цел да се добие уридин трифосфат (UTP) и цитидин трифосфат (CTP). Сите ензими кои се неопходни за биосинтеза на пиримидинските нуклеотиди кај растенијата се локализирани во пластидите како примарни места за биосинтезата на пиримидини во клетките.

Биосинтезата на пуринските нуклеотиди кај растенијата не е доволно проучена и се претпоставува дека се одвива на сличен начин како и кај другите организми. Пуринските нуклеотиди се синтетизираат директно од PRPP преку последователна адиција на прекурсори со пуринска структура: глицин, CO_2 , амидни групи од аспартат и глутамин, како и метенил и формил тетрахидроfolати (Сл. 1.4). Од друга страна пак, при биосинтеза на пиримидинските нуклеотиди, пиримидинот оротат се синтетизира како слободна база, а потоа се поврзува со PRPP преку формирање на N-гликозидна врска. Според досегашните истражувања, биосинтезата на пуринските нуклеотиди се одвива во цитоплазмата на растителната клетка.

Деоксирибонуклеотидите потекнуваат од соодветните рибонуклеотиди. Рибозата од рибонуклеотидите се редуцира под дејство на ензимот рибонуклеотид редуктаза. Ензимот тимидилат синтаза катализира трансфер на метилна група од метенил тетрахидроfolат на C-5 атомот од деоксиуридин 5'-монофосфат (dUMP), при што се формира деокситимидин 5'-монофосфат (dTMP) преку. Ензимската реакција на тимидилат синтаза претставува единствен интрацелуларен извор на *de novo* dTMP. Според тоа, овој ензим има есенцијално значење за континуирано одржување на приносот на четирите деоксинуклеотидни трифосфати кои се неопходни за репликација на DNA. Исто така, ензимот тимидилат синтаза има важна улога во одржувањето на деоксиуридинските нуклеотиди во ниска концентрацијата со цел да се спречи инкорпорацијата на овие нуклеотиди во DNA-молекулите. Кај некои растенија (*Lemna major*) постои алтернативен пат преку кој се врши метилирање на деоксицитидин 5'-дифосфат и деаминација на формираниот производ, при што се добива деокситимидин 5'-дифосфат.



Слика 1.3 *De novo* биосинтетски патишта на пиримидински нуклеотиди. Првиот производ со пиримидинска структура е оротат кој стапува во реакција со 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP) и се формира нуклеотидот оротидин 5'-монофосфат (ОМР). Декарбоксилацијата на ОМР овозможува формирање на уридин 5'-монофосфат (UMP). Формираниот уридин 5'-трифосфат (UTP) преку реакција на аминација се конвертира во цитидин 5'-трифосфат (СТР) со посредство на глутамин како донор на аминокиселина. UDP: уридин 5'-дифосфат (Buchanan и сор., 2015).



Слика 1.4 *De novo* биосинтетски патишта на пурински нуклеотиди. Синтезата на пурински нуклеотиди се одвива преку модификација на 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP) за да се формира инозин 5'-монофосфат (IMP) како прв производ со пуринска структура. Аденозин 5'-монофосфат (AMP) и гванозин 5'-монофосфат (GMP) се добиваат од IMP. Реакциите за добивање на AMP опфаќаат адиција на аспартат на IMP, а потоа се врши отстранување на јаглеродниот скелет на фумарат. Реакциите за добивање на GMP опфаќаат оксидација на IMP, а потоа се одвива аминација со глутамин. THF: тетраhydrofolat (Buchanan и сор., 2015).

Катаболизмот на нуклеотидите кај растенијата не е доволно проучен. Според досегашните научни сознанија, молекулите на DNA и RNA се хидролизираат до олигонуклеотиди под дејство на ензимите деоксирибонуклеази или рибонуклеази, соодветно. Потоа, олигонуклеотидите се хидролизираат под дејство на фосфодиестерази и се добиваат мононуклеотиди, кои подлежат на натамошна хидролиза до нуклеозиди со посредство на ензимите нуклеотидази и фосфатази. Добиените слободни нуклеозиди и бази од хидролизата на нуклеотидите можат повторно да се конвертираат во нуклеотиди преку т.н. „патишта на спасување“ (salvage pathways). За разлика од *de novo* биосинтетските патишта на пурини и пиримидини кои се слични кај животните и растенијата, биосинтезата на нуклеотиди преку „патиштата на спасување“ не се доволно проучени и се претпоставува дека постојат значајни разлики помеѓу овие две групи на организми. Биосинтезата на нуклеотиди преку „патиштата на спасување“ се класифицираат во две категории. Првата категорија опфаќа единична реакција која е катализирана од страна на ензимот фосфорибозилтрансфераза (Табела 1.1).

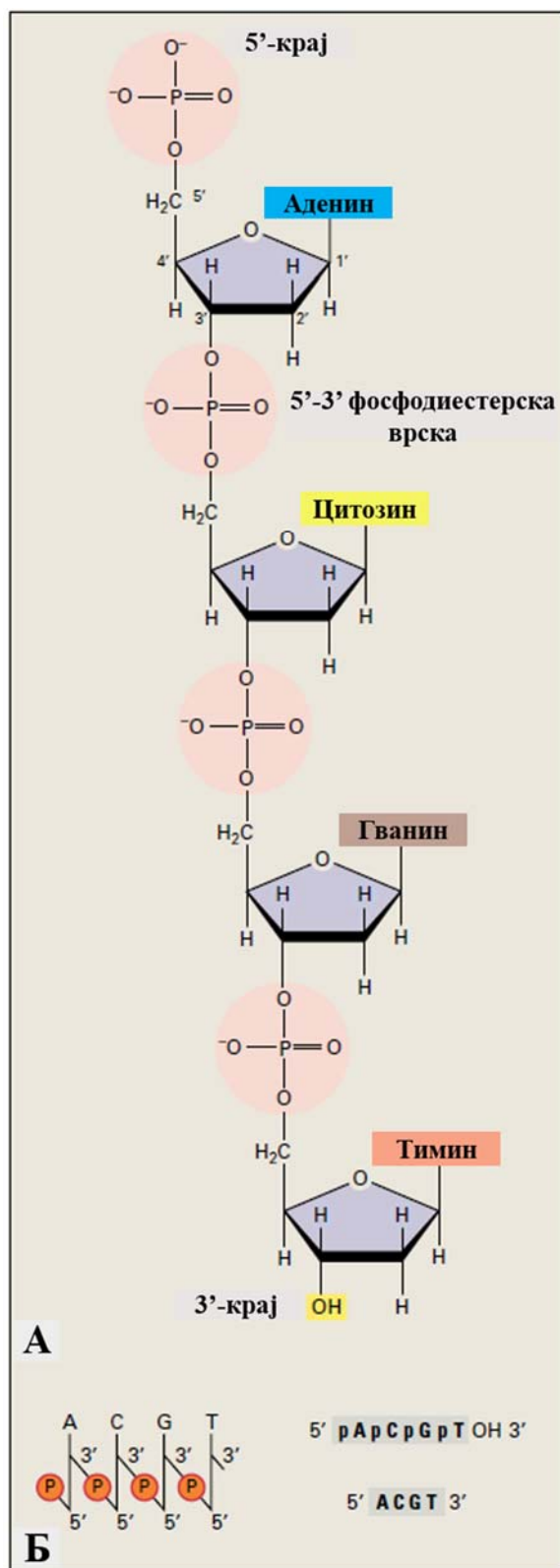
Табела 1.1 Реакции на биосинтеза на нуклеотиди преку „патишта на спасување“.

Ензим	Реакција
Фосфорибозилтрансфераза	Азотна база + PRPP $\leftrightarrow$ Рибонуклеотид + PPi
Нуклеозид фосфорилаза	Азотна база + (деокси)Рибоза1-P $\leftrightarrow$ (деокси)Нуклеозид + Pi
Нуклеозид киназа	(деокси)Нуклеозид + ATP $\rightarrow$ (деокси)Нуклеотид + ADP

Оваа реакција е реверзибилна во присуство на пирофосфатаза и се одвива во пластидите на растителните клетки. Втората категорија од „патиштата на спасување“ опфаќа две реакции кои се катализираат под дејство на ензимите нуклеозид фосфорилаза и нуклеозид киназа (Табела 1.1). Формирањето на нуклеотиди под дејство на ензимот нуклеозид киназа е иреверзибилна реакција.

1.1.3 Нуклеинските киселини се составени од нуклеотиди поврзани со фосфодиестерски врски

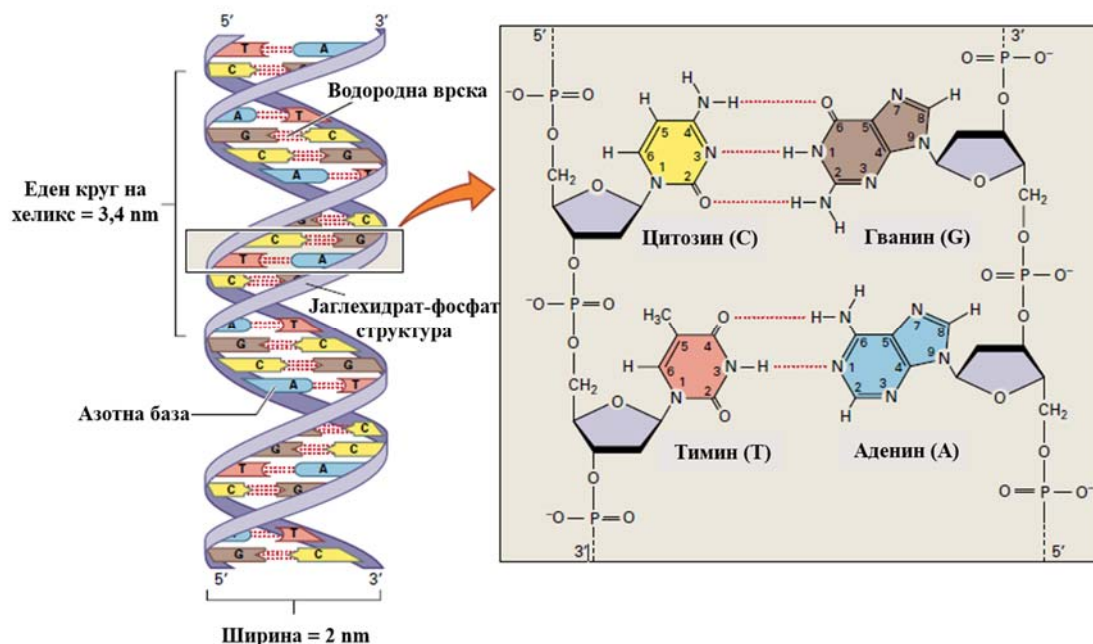
Нуклеотидите во нуклеинските киселини се меѓусебно поврзани во полинуклеотидна верига. Ковалентните фосфодиестерски врски овозможуваат поврзување на 5' јаглеродниот атом од еден нуклеотид со 3' јаглеродниот атом на соседниот нуклеотид, при што се формира јаглехидрат-фосфатна структура за која се поврзуваат азотните бази (Сл. 1.5А). Ориентацијата на овие врски покажува дека линеарниот синцир има два различни краеви со специфични биохемиски карактеристики. Притоа, 5' крајот на нуклеинската киселина има слободна фосфатна група, додека пак, 3' крајот завршува со хидроксилна група. Според тоа, полинуклеотидните секвенци се пишуваат од 5' кон 3', односно од лево кон десно (Сл. 1.5Б). Доминантна форма на DNA молекулот е двојноверижен синцир со двојно-спирална структура која е составена од две индивидуални полинуклеотидни вериги со специфично спарување на азотните бази. Водородните врски овозможуваат поврзување на големата пуринска база од едниот синцир (А или G, соодветно) и малата пиримидинска база од другиот синцир (Т или C, соодветно). Азотните бази А и Т се меѓусебно поврзани со две водородни врски, додека пак, базите G и C се поврзани со три водородни врски (Сл. 1.6).



Двете вериги се антипаралелни, односно јагледхидрат-фосфатните структури на веригите се ориентирани во спротивни правци. Краевите 5' и 3' од геномот кај едноверижни DNA вируси се поврзани со фосфодиестерска врска, при што се формира циркуларен молекул.

Повеќето клеточни RNA молекули се едноверижни, меѓутоа, нуклеотидниот синџир може да се свиткува на одредени места. Формираните домени претставуваат двојноверижни региони кои содржат “Watson–Crick” базни спарувања (G–C и A–U), голем број атипични базни спарувања (G–U, U–U, G–A), како и терминални едноверижни јамки. Овие домени можат меѓусебно да се поврзуваат преку различни типови на терциерни интеракции, при што RNA молекулите добиваат компактна структура.

Слика 1.5 А) Полинуклеотиден синџир на DNA молекул. Полимерот од јагледхидрат-фосфат ја формира структурата на полинуклеотидниот синџир. Кај молекулот на RNA, 2'-ОН групата ја заменува 2'-H групата. (Б) Нуклеинските киселини се претставени од 5' кон 3' (од лево кон десно). Во повеќето случаи, секвенците на нуклеинските киселини не ги прикажуваат симболите за јагледхидрат-фосфат структурата (Buchanan и сор., 2015).



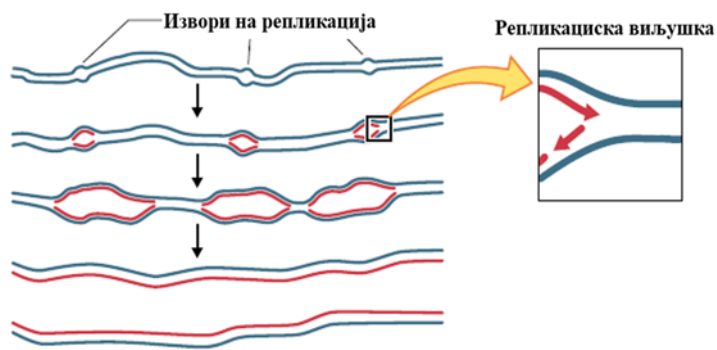
Слика 1.6 Двоен хеликс на DNA молекул. Двете вериги на DNA се поврзуваат како резултат на спарување на комплементарните азотни бази. Цитозинот и гванинот се меѓусебно поврзани со три водородни врски, додека пак, аденинот и тиминот се поврзани со две водородни врски. Двете вериги на DNA се антипаралелни и започнуваат од 5' кон 3' во спротивни правци (Buchanan и сор., 2015).

1.2 Репликација на јадрена DNA

Процесот на клеточна делба опфаќа формирање на нова копија на клеточните хромозоми. Хромозомите кај еукариотските клетки се изградени од хроматин, кој претставува филаментозен комплекс на DNA и протеини. Имајќи предвид дека долгите DNA молекули се цврсто спакувани во DNA-протеински комплекси, репликацијата на DNA се одвива со посредство на голем број ензими и регулаторни протеини. Репликацијата на јадрената DNA била проучувана кај голем број организми, особено кај бактерии, квасци и мамалиски клетки. Кај сите организми, репликацијата на DNA се одвива во три фази: иницијација, елонгација и терминација. Кај еукариотските организми, краевите на линеарните хромозоми подлежат на модификации со цел да се спречи губењето на DNA при последователните циклуси на репликација. Репликацијата на DNA кај сите еукариотски организми се одвива на сличен начин. Сепак, некои регулаторни механизми при репликацијата на DNA кај растенијата можат да се адаптираат според стадиумот на развиток или физиолошката функција.

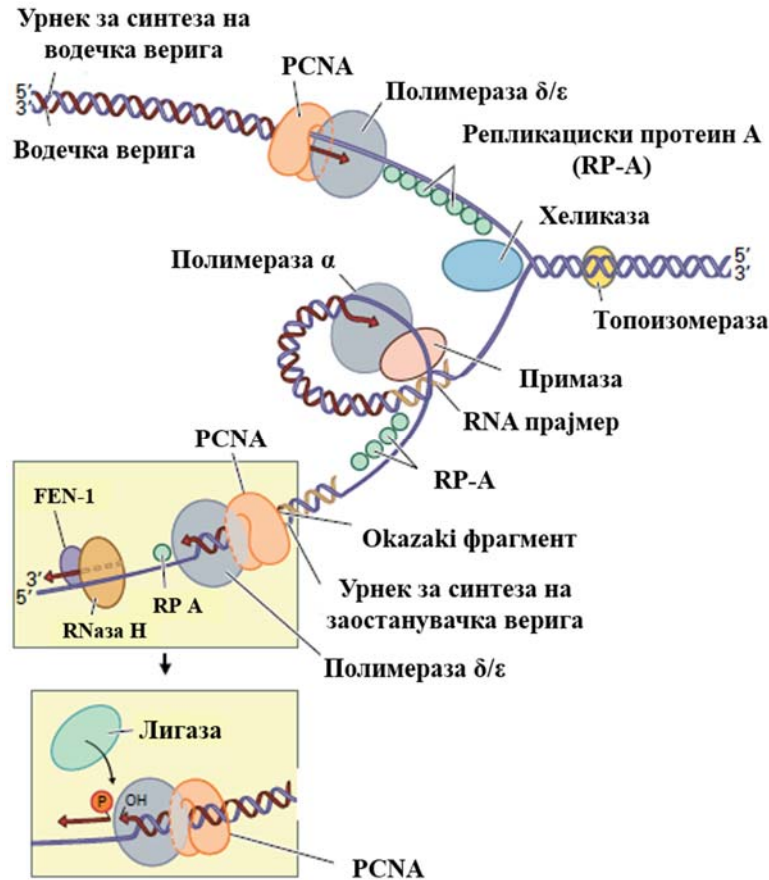
1.2.1 Синтезата на јадрена DNA вклучува комплексен клеточен механизам кој е составен од голем број протеини

Репликацијата на DNA се одвива во S фазата од клеточниот циклус и претставува високо регулиран процес. Процесот на репликација започнува на повеќе специфични места познати како **извори на репликација (origins of replication)**, (Сл. 1.7).



Слика 1.7 Репликацијата започнува на специфични DNA секвенци наречени извори на репликација, кои се распоредени по должината на DNA. Секој извор на репликација формира две репликациски виљушки кои се движат во спротивни правци сè додека не се спојат со репликациските виљушки од соседните извори на репликација. Родителските вериги на DNA се прикажани со сина боја, додека пак, новосинтезираните вериги се претставени со црвена боја (Buchanan и сор., 2015).

Изворите на репликација во еукариотските хромозоми биле успешно идентификувани кај квасецот *Saccharomyces cerevisiae*. Притоа, специфична секвенца со големина од 200 bp означена како автономно-репликациска секвенца (autonomously replicating sequence-ARS) претставува минимална секвенца која е неопходна за иницирање на репликацијата на хромозомската DNA. Кај мамалиските клетки, иницијацијата на репликација на DNA се одвива на специфични секвенци кои се раздвоени со региони од 10 kb. Минималната секвенца која го претставува изворот на репликација кај еукариотите сè уште не е позната. Исто така, кај растенијата не се идентификувани специфични извори на репликација. Иако постојат голем број извори на репликација во хромозомите, сите овие потенцијални секвенци не се активни во секоја клетка. Сегментот на DNA кој се реплицира од единичен извор на репликација се нарекува репликон. Карактеристичните репликони кај растителните клетки имаат должина од 50 до 70 kb. Така на пр., хибридниот алохексаплоиден вид *Triticale* има репликони со големина од околу 22 kb. Од друга страна пак, родителските растенија на *Triticale* (рж и пченица) имаат репликони со големина од 50 до 60 kb. Овие податоци покажуваат дека изворите на репликација во клетките од родителските видови се стивнати, а можат да се активираат кај хибридниот *Triticale*. Исто така, сите извори на репликација во еден хромозом не се активираат истовремено кога репликацијата на DNA се иницира во S фазата од клеточниот циклус. Изворите на репликација се активираат според репродуктивен редослед. Времето на активирање на одреден извор на репликација е значајно регулиран процес во клетката и зависи од степенот на кондензација на хроматинот каде што се одвива репликацијата. Активацијата на изворите на репликација за време на S фаза од клеточниот циклус е особено проучуван процес кај квасци и мамалиски клетки. Иницијацијата на процесот на репликацијата на DNA започнува откако ќе настане декондензација на структурата на хроматинот. Притоа, двете вериги на DNA се одвојуваат во регион кој е богат со AT и настанува врзување на специфични репликациски протеини за DNA молекулот (Сл. 1.8). Поради тоа што двојниот хеликс на DNA е високо стабилен во нормални услови, специфични АТР-зависни ензими означени како DNA хеликази катализираат одвојување на веригите на изворите на репликација, како и по должината на репликациската виљушка. Активноста на DNA хеликаза е проследена со врзување на репликацискиот протеин А (RP-A) за едноверижна DNA, при што настанува стабилизација на нејзината структура. За време на процесот на репликација, DNA топоизомеразата ја елиминира суперспирализираноста на DNA пред репликациската виљушка.



Слика 1.8 Организацијата на DNA репликациската виљушка кај еукариотите покажува дисконтинуирана репликација на заостанувачката верига. Координираната синтеза на водечката и заостанувачката верига се одвива со посредство на комплекс од хеликаза и две молекули на DNA. Топоизомеразата делува пред репликациската виљушка за да се отстрани суперспирализираноста која настанува при одмотување на DNA. Водечката DNA верига континуирано се издолжува кон репликациската виљушка како резултат на додавање на нуклеотиди. Од друга страна пак, заостанувачката DNA верига се синтетизира на изолирани сегменти познати како Okazaki фрагменти. Натомошната синтеза на водечката верига и отворањето на репликациската виљушка овозможува експонирање на местата за прајмери на урнекот на заостанувачката верига. Откако ќе се синтетизира краток RNA прајмер од страна на ензимот примаза, DNA полимеразата α додава нуклеотиди на новиот фрагмент сè додека неговиот 3' крај не достигне до прајмерот на соседниот фрагмент. Координираното дејство на FEN-1 нуклеаза (врши прекини помеѓу RNA прајмерот и новиот синцир на DNA) и RNAза H (катализира деградација на RNA прајмерите) овозможува формирање на празнини. Овие празнини се пополнуваат од страна на DNA полимеразите δ/ϵ и со посредство на DNA лигаза настанува спојување на фрагментите на заостанувачката DNA верига. Пролиферирачкиот клеточно-јадрен антиген (proliferating cell nuclear antigen-PCNA) е протеински кофактор на DNA полимеразата комплексот. Репликацискиот протеин А (RP-A) се врзува и ја стабилизира едноверижната DNA (Buchanan и сор., 2015).

1.2.2 Репликацијата на јадрена DNA се одвива според семи-конзервативен и семи-континуиран модел

При одвивање на процесот на репликација на DNA од изворот на репликација, мултиензимски комплекс составен од **DNA полимераза** катализира адиција на деоксирибонуклеотиди на 3' крајот од новосинтетизираните вериги. Според тоа, синтезата на DNA се одвива од 5' кон 3' правец, додека пак, урнек веригата се чита од 3' кон 5' правец,

при што се формира асиметрична структура при репликациската виљуша (Сл. 1.8). Ензимите DNA полимерази можат да додаваат нуклеотиди само на пре-постоечка верига (**прајмер**). Всушност, овие ензими се активираат кога прајмер со слободна 3'-хидроксилна група ќе се поврзе со водородна врска за DNA-урнекот кој се реплицира. Прајмерите се синтетизираат под дејство на специфични рибонуклеотидни полимерази познати како DNA примази, кои вршат синтеза на прајмери со пурински рибонуклеотиди.

Поради асиметричната структура на репликациската виљушка, синтезата на DNA се одвива на семидисконтинуиран начин. Адицијата на нуклеотиди на едната верига од новосинтетизирана DNA се одвива на континуиран начин и оваа т.н. **водечка верига** започнува како единичен прајмер. Од друга страна пак, другата **заостанувачка верига** се синтетизира од кратки дисконтинуирани DNA сегменти кои се означени како Okazaki фрагменти, при што секој од нив започнува од сопствен прајмер (Сл. 1.8). Синтезата на континуирана DNA верига од голем број фрагменти на заостанувачката верига настанува под дејство на DNA репарирачки систем составен од RNаза H и DNA лигаза. Притоа, RNаза H е специфична нуклеаза (RNаза H) која врши отстранување на RNA прајмерот и го заменува со DNA. Ензимот DNA лигаза врши спојување (лигација) на 3' крајот од новиот DNA фрагмент за 5' крајот од низводниот DNA фрагмент. Поради тоа што двете вериги на јадрената DNA претставуваат урнеци за синтеза на DNA, производите на репликација содржат една оригинална и една новосинтетизирана комплементарна верига. Овој тип на репликација на DNA е означен како семиконзервативен модел (Сл. 1.7).

Во јадрото на еукариотите (вклучувајќи ги растенијата) се идентификувани три главни холоензими на DNA полимерази кои вршат репликација на јадрената DNA: α , δ и ϵ . Холоензимот DNA полимераза α често пати дисоцира од урнекот на DNA и затоа не синтетизира долги синцири на нуклеотиди. Сепак, две од четирите субединици на DNA полимераза α имаат активност на DNA примаза и затоа овој ензим примарно функционира како примаза при синтеза на заостанувачката верига на DNA (Сл. 1.8). При дисоцијација на DNA полимераза α од DNA урнекот настанува експонирање на крајот на прајмерот. Потоа, за овој крај на прајмерот се врзува репликациски фактор составен од голем број субединици, при што се олеснува асемблирањето на комплексот од функционална DNA полимераза δ или ϵ за да се комплетира синтезата на Okazaki фрагментот. За разлика од DNA полимераза α , DNA полимеразите δ и ϵ остануваат поврзани за DNA урнекот со посредство на клеточно-јадрен пролиферирачки антиген (proliferating cell nuclear antigen-PCNA). Всушност, PCNA претставува есенцијален протеински кофактор на комплексот на DNA полимераза, кој формира прстеневидна структура околу DNA молекулот. Повеќето од компонентите вклучени во репликација на DNA се прикажани на Сл 1.8 како индивидуални комплекси. Сите овие компоненти стапуваат во меѓусебна интеракција и формираат голем комплекс на репликациски систем при репликациската виљушка кој е составен од голем број субединици. Важно е да се напомене дека репликацијата на DNA се одвива во одвоени „жаришта“ од јадрото на мамалиските клетки. Овие „жаришта“ се нарекуваат репликациски центри и можат да содржат до 100 репликациски виљушки. Репликацијата на DNA се одвива со висок степен на точност, бидејќи се јавува само една грешка во просек на секои 10^9 реплицирани базни парови. **Репарацијата (поправката) на погрешното спарување на бази (mismatch repair)** и 3'→5' егзонуклеазната активност на DNA полимеразите δ и ϵ го одржуваат овој висок степен на точност при репликацијата. Познато е дека DNA полимеразите се само-корективни ензими кои ги отстрануваат сопствените полимеризациски грешки за време на репликацијата. Исто така, 3'→5' егзонуклеазна

активност ја зголемува точноста на репликација преку процесот означен како „лекторирање“ (**proofreading**). Овие ензимски активности можат да ги отстранат погрешно спарените нуклеотиди од 3'-крајот на новосинтетизираната верига. Иако DNA полимеразата α не поседува 3'→5' егзонуклеазна активност, овој ензим покажува висок степен на точност при репликацијата. Отсуството на 3'→5' егзонуклеазна (лекторска) активност кај DNA полимеразата α може да се компензира преку способноста на ензимот за отстранување на RNA-прајмери и неколку полимеризирани деоксирибонуклеотиди, што е проследено со DNA репарација на погрешното спарување на бази.

1.2.3 Еукариотските хромозоми имаат краеве кои се заштитени со теломери

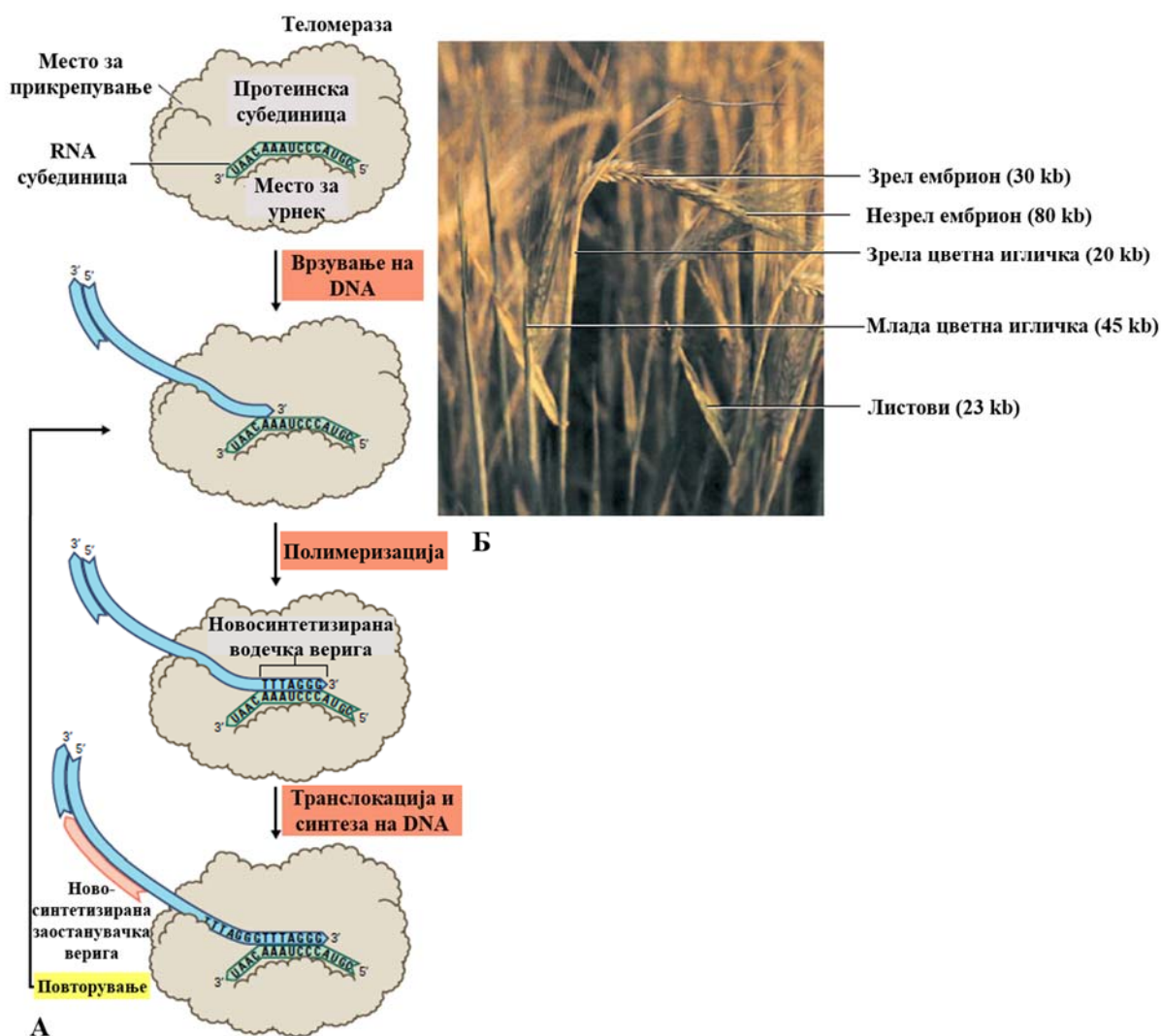
Терминација или завршување на репликацијата настанува при спојување на новосинтетизираните DNA вериги од два извори на репликација. Во геномот на *Escherichia coli* постојат специфични секвенци во близина на регионот на терминација кои се означени како *Ter*-места и имаат функција во запирање на синтезата на новата верига во еден правец. Новосинтетизираната верига од другиот правец поминува преку *Ter* местото и настанува хомологна рекомбинација помеѓу двете новосинтетизирани вериги. Ваков механизам најверојатно постои и кај еукариотите, бидејќи кај квасците се идентификувани слични DNA секвенци и *Ter*-места.

Познато е дека DNA полимеразите функционираат во присуство на нуклеотидни прајмери за иницирање на репликацијата на DNA. Ако овие прајминг места се локализирани на крајот од еден линеарен хромозом, тогаш овој краток DNA сегмент ќе остане нереплициран по деградација на прајмерот и нема да биде достапен за наредниот циклус на репликација на DNA. Последица од овој процес може да биде делеција на краток сегмент од хромозомот за време на секој циклус на репликација на DNA. Сепак, ваков тип на делеции не се случуваат и хромозомите имаат стабилна должина бидејќи хромозомските краци завршуваат со специфични DNA секвенци познати како **теломери**. Овие секвенци се слични кај сите еукариотски клетки и опфаќаат повеќекратни тандемски повторувања на кратки DNA секвенци, како на пр. TTAGGG кај луѓето и TTTAGGG кај *Arabidopsis* (Сл. 1.9).

<i>Homo sapiens</i>	TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
<i>Paramecium</i>	TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
<i>Trypanosoma</i>	TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGGTTTAGGGTTTAGGG

Слика 1.9 Теломерите се повторувачки DNA секвенци кои се локализирани на краевите на еукариотските хромозоми. Иако постои еволутивна дивергентност кај еукариотските организми, повторувачките секвенци на теломерната DNA се карактеризираат со висок степен на конзервираност (Buchanan и сор., 2015).

Ензимот теломераза ја препознава веригата богата со гванин од теломерот и го продолжува 3' крајот на хромозомската DNA преку адиција на нови повторувачки (репетитивни) секвенци на теломерот. Сите познати теломеразии содржат специфични RNA молекули кои се дел од ензимскиот комплекс и служат како комплементарен урнек за синтеза на репетитивната секвенца на теломерот (Сл. 1.10). Откако теломеразата ќе ископира неколку теломерни повторувачки секвенци од сопствениот RNA урнек, тогаш настанува синтеза на комплементарната DNA верига која е богата со цитозин. Всушност, теломерните репетитивни секвенци служат како прајмер место за елонгација на синцирот со цел да се овозможи комплетирање на незавршената верига под дејство на DNA полимеразата.



Слика 1.10 (А) Елонгација на теломери. Теломеразите ги препознаваат 3'-протрузиите на теломерните секвенци од хромозомот. Молекулот на RNA е комплементарен со теломерната DNA и претставува составен дел од ензимскиот комплекс на теломеразата. Протрузијата на DNA од водечката верига хибридизира со RNA субединицата на теломераза која се користи како урнек, при што настанува елонгација на теломерната DNA. Потоа, теломеразата се транслоцира до крајот на водечката верига од теломерната DNA. Ензимите примаза и DNA полимераза вршат елонгација на заостанувачката верига од теломерната DNA (Buchanan и сор., 2015). (Б) Теломерите немаат константна должина во текот на развитокот на растенијата. Теломерите кај хромозомите од јачмен имаат различна должина во зависност од типот на органи и стадиумот на развиток (Shippen и McKnight, 1998).

Теломеразата била откриена кај протистите од родот *Tetrahymena*, додека пак, овој ензим бил изолиран од квасците и анималните клетки. Растителните хромозоми имаат високо конзервирани теломерни секвенци и активноста на теломеразата била потврдена кај растенијата. Овие податоци покажуваат дека одржувањето на теломерите кај растителните клетки се одвива на сличен начин како и кај другите еукариотски организми.

1.2.4 Времето на репликација на јадрената DNA е строго регулиран процес

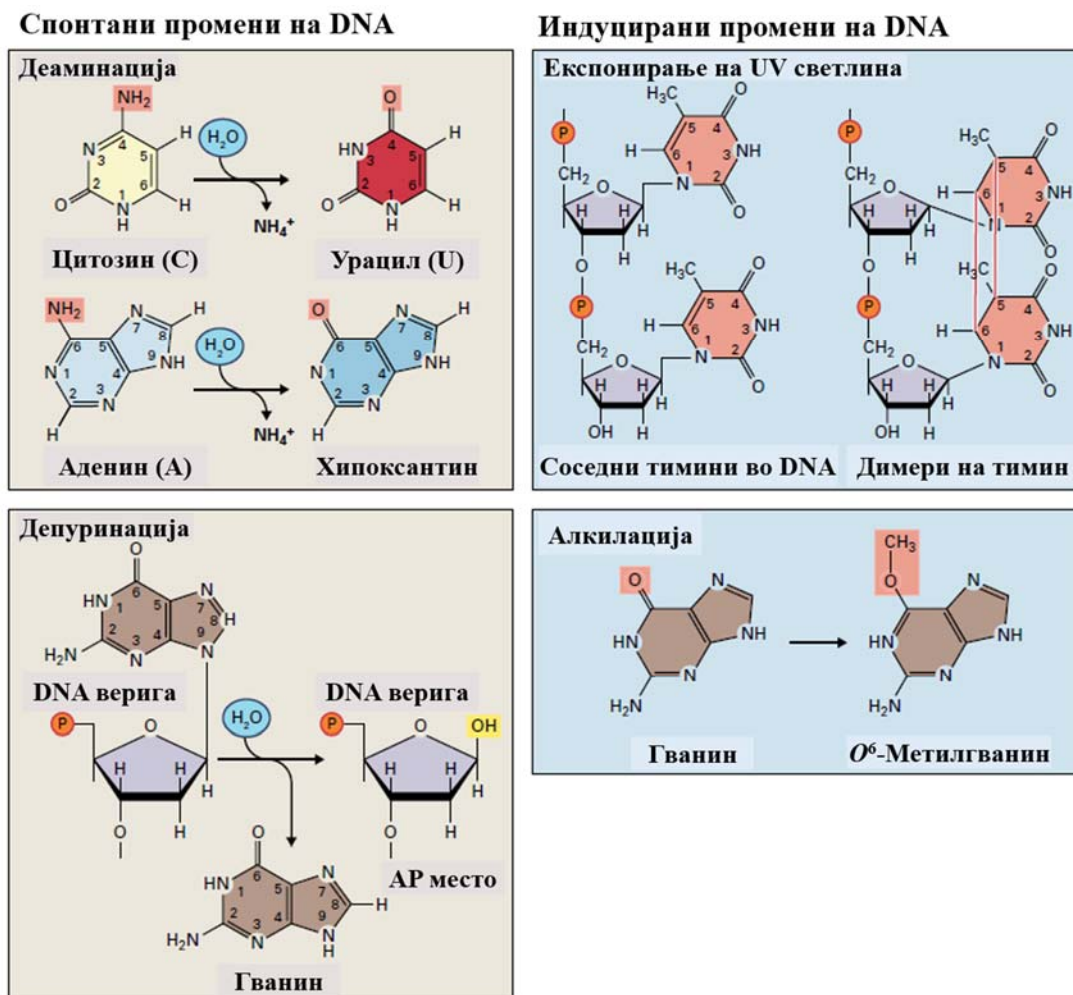
Целокупната хромозомска DNA се реплицира за време на S фазата од клеточниот циклус, меѓутоа времето на репликација на одреден DNA сегмент зависи од структурата на хроматинскиот регион во кој се наоѓа овој сегмент. Хроматинот кој задржува високо кондензирана конформација за време на интерфазата од клеточниот циклус се нарекува **хетерохроматин**. Притоа, репликацијата на DNA од хетерохроматинот се јавува во доцниот стадиум од S фазата на клеточниот циклус. Истражувањата кај квасецот *S. cerevisiae* покажале дека DNA сегментите кои се локализирани во близина на теломерите се реплицираат во доцниот стадиум од S фазата, додека пак, DNA сегментите кои се асоцирани со центромерите на хромозомите се реплицираат во раниот период од S фазата. Сепак, автономно-репликациска секвенца (ARS) која е асоцирана со теломерот може да се реплицира во раниот стадиум од клеточниот циклус ако настане релокализација на оваа секвенца на друго место од хромозомот. На сличен начин, ако мали сегменти од теломерната DNA се инсертираат во близина на изворот на репликација во хромозомот кој ја иницира DNA репликацијата во раниот стадиум, тогаш настанува одложување на активацијата на изворот на репликација. Од друга страна пак, DNA сегментите кои активно се транскрибираат се локализирани во **еухроматинот**. Всушност, еухроматинот претставува хромозомски регион кој содржи хроматин со ниско кондензирана конформација. Овие еухроматински DNA сегменти се реплицираат во раниот стадиум од S фазата, што покажува дека експресијата на гените може да влијае врз времето на репликација на DNA. Така на пр., репликацијата на гени со конститутивна транскрипција во клетките се одвива во раниот стадиум од клеточниот циклус. Од друга страна пак, гените кои кодираат протеини со ткивно-специфични функции се реплицираат во зависност од нивната активност во клетките. Имено, репликацијата на гените со активна експресија во клетките се одвива во раниот стадиум, додека пак, репликацијата на гени кои не се експресираат во клетките се одвива во доцниот период од клеточниот циклус. Според тоа, времето на репликација не зависи само од локализацијата на DNA секвенците во близина на изворот на репликација, туку и од други регулаторни компоненти кои ја контролираат иницијацијата на репликација на DNA.

1.3 Репарација на DNA

1.3.1 Оштетувањата на DNA молекулите можат да предизвикаат мутации

Молекулите на DNA се постојано експонирани на физички и хемиски стрес фактори во *in vivo* услови. Кислородот, ултравиолетовото (UV) зрачење, алкилирачките агенси и реактивните радикали можат да предизвикаат промени во DNA секвенцата. Овие промени опфаќаат прекини на DNA веригите, хемиска модификација на базите, како и инкорпорација на погрешни бази за време на репликацијата. Карактеристични промени на DNA се формирање на пиримидински димери, алкилација и деаминација на бази (Сл. 1.11). Спонтаните или индуцираните оштетувања на DNA значајно ќе ја изменат DNA секвенцата ако овие промени не се коригираат. Така на пр., спонтаната деаминација на цитозинот во урацил се јавува на 100 бази од геномот за време од еден ден. За време на репликацијата, урацилот ќе предизвика трајна промена на DNA секвенцата преку спарување со аденин наместо со гванин. Повеќето оштетувања на DNA се случуваат во некодирачки генски

секвенци, односно овие промени немаат никакви последици. Од друга страна пак, оштетувањата на DNA кои предизвикаат мутации и ја нарушуваат функцијата на есенцијалните ензими или структурните протеини можат да имаат негативни последици врз клетките. Сепак, клетките поседуваат голем број на DNA репарирачки механизми за заштита од негативните ефекти на мутациите.

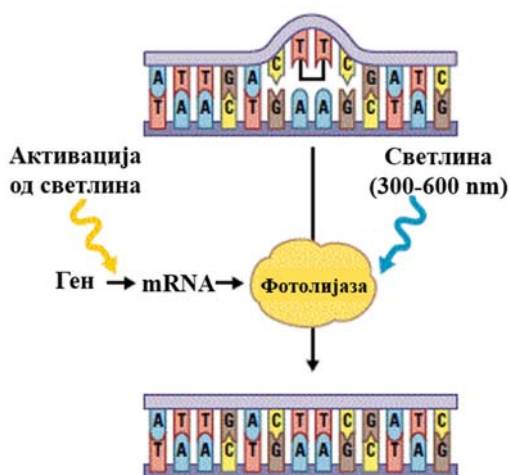


Слика 1.11 Хемиските реакции кои предизвикуваат мутации на DNA можат да се јават спонтано или индуцирано под дејство на зрачење или хемиски средства. Спонтаното оштетување на DNA опфаќа деаминација на базите цитозин или аденин. Исто така, депуринацијата е процес на спонтано формирање на апуриноско (AP) место во молекулот на DNA. UV светлината индуцира формирање на пиримидински димери помеѓу соседните пиримидински бази. Алкилацијата на DNA претставува адиција на метилни групи на различни позиции во прстенот на азотната база (Buchanan и сор., 2015).

1.3.2 Пиримидинските димери предизвикани од UV-B зрачење можат да се репарираат под дејство на видлива светлина или UV-A зрачење

Ултравиолетовата светлина може да предизвика фузионирање на пиримидините, при што се формираат циклобутански димери (Сл. 1.11) и пиримидин(6→4)пиримидинонски димери. Растенијата и луѓето се подложни на еднаков степен на DNA оштетувања под

дејство на UV-A (320-400 nm) и UV-B (280-320 nm) зрачењето од сончевата светлина. Кај бактериите и растенијата, некои UV-индуцирани мутации можат да бидат реверзибилни со примена на високо енергетска бранова должина на видливата светлина или UV-A зрачењето. Оваа конверзија се нарекува **фотореактивација** и се катализира под дејство на ензимите фотолијази. Фотолијазите апсорбираат енергија со бранова должина од 300 до 600 nm и овозможуваат конвертирање на циклобутанските димери во пиримидински мономери (Сл. 1.12).

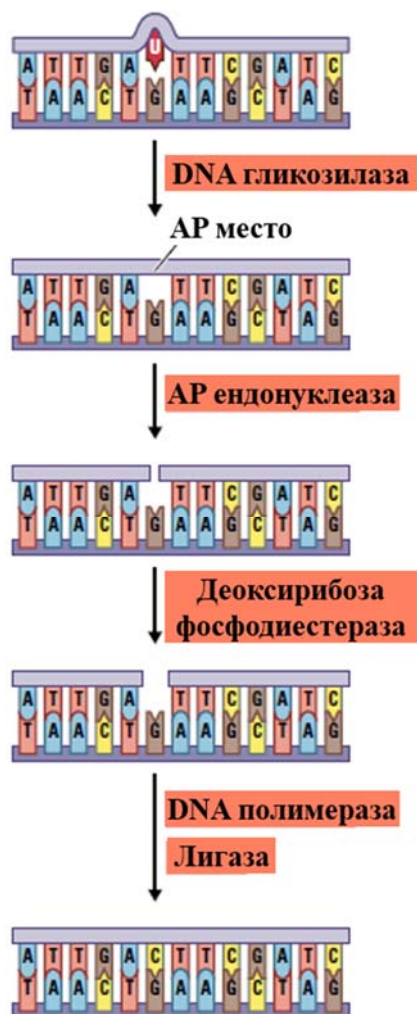


Слика 1.12 Ензимите фотолијази катализираат репарација на пиримидински димери. Фотолијазата користи енергија од видливата светлина за да ги прекине ковалентните C-C врски кои ги поврзуваат пиримидински димери индуцирани под дејство на UV светлина (Buchanan и сор., 2015).

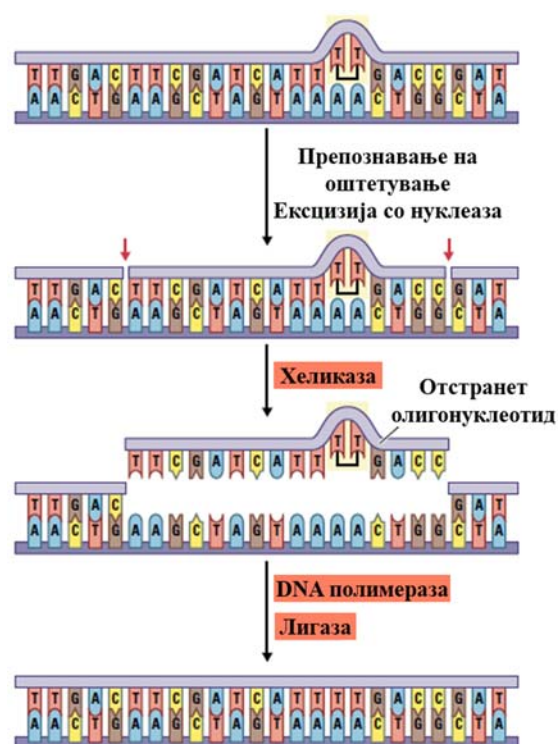
Активирањето на фотолијазите кај растенијата се регулира под дејство на светлина и овој процес се посредува преку фоторецепторот фитохром. Фотолијазата била идентификувана кај *Arabidopsis* и пченица (*Triticum spp.*) и нејзината конститутивна експресија во клетките е неопходна за репарација на пиримидин(6 → 4)пиримидинонски димери.

1.3.3 Механизмот на репарација со ексцизија може да отстрани поединечни бази или подолги нуклеотидни вериги

Репарацијата на DNA со ексцизија опфаќа два типа на механизми: **репарација со ексцизија на бази** и **репарација со ексцизија на нуклеотид**. При репарацијата со ексцизија на бази настанува отстранување на хемиски модифицираната база (урацил, 5-метилцитозин или 3-метиладенин) под дејство на ензимот DNA-гликозилаза. Дејството на DNA гликозилаза предизвикува формирање на апуриноско или апириимидинско (AP) место со интактна јагледрихидрат-фосфатна структура. Потоа, ензимот AP-ендонуклеаза ја сече фосфодиестерската врска кај AP местото и со посредство на неколку ензими се овозможува репарација на пресеченото место. Имено, DNA деоксирибоза фосфодиестераза го отстранува деоксирибоза-фосфатниот молекул. Потоа, репарирачка полимераза (DNA-полимераза β кај анимални клетки и квасци) додава единичен нуклеотид на празнината од 3' крајот на DNA-веригата, а DNA лигаза го спојува прекилот. На таков начин настанува замена на целиот нуклеотид на местото каде што претходно имало модифицирана база (Сл. 1.13). Кај растенијата се изолирани хомолози на гените кај квасци кои кодираат протеини вклучени во механизмот на репарација со ексцизија на бази. Притоа, овие генски производи кај растенијата покажале способност за ексцизија на специфични DNA-оштетувања.



Слика 1.13 Механизам на репарација на DNA со ексцизија на база. Формираниот урацил со деаминација на цитозин се отстранува од јаглекхидрат-фосфат структурата на DNA под дејство на DNA гликозилаза. Ензимот АП-ендонуклеаза го препознава добиеното апуриноско или апиридиноско (АП) место и врши прекин на DNA-веригата на тоа место. Потоа, ензимот деоксирибоза фосфодиестераза го отстранува преостанатиот молекул на деоксирибоза. Ензимите DNA полимераза и DNA лигаза ја репарираат празнината и го обновуваат цитозин/гванин базниот пар (Buchanan и сор., 2015).

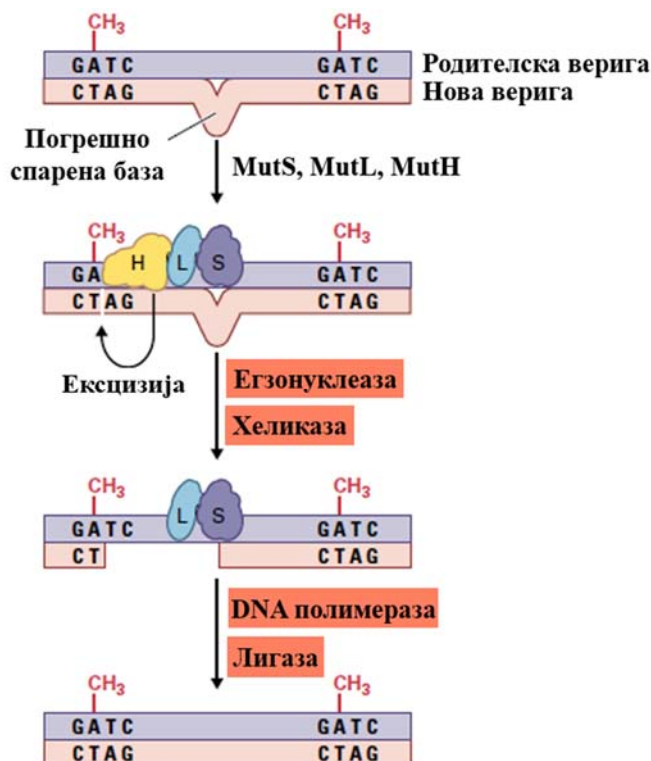


Слика 1.14 Механизам на репарација со ексцизија на нуклеотид кај пиримидински димери. При овој механизам се користи системот за DNA репликација со цел да се отстранат големи оштетувања на двојниот DNA хеликс, како што се пиримидинските димери индуцирани под дејство на UV светлина. Оштетувањата на DNA се препознаваат од страна на ендонуклеазите кои вршат ексцизија на молекулот на DNA (црвени стрелки). Потоа, хеликазата ја одмотува DNA која што содржи оштетени бази и олигонуклеотидот се отстранува од ова место. Ензимите DNA полимераза и DNA лигаза ја обновуваат формираната празнина (Buchanan и сор., 2015).

При репарацијата со ексцизија на нуклеотид е вклучен механизмот на репликација на DNA. Овој репаративен механизам може да отстрани DNA оштетувања кои вршат дисторзија на двојниот хеликс на DNA, вклучувајќи различни пиримидински димери индуцирани под дејство на UV светлина. Кај еукариотските клетки, репарацијата со ексцизија на нуклеотиди овозможува отстранување и заменување на DNA фрагмент со должина од околу 30 базни парови. При овој механизам, дисторзијата во DNA ја препознава мултиензимски комплекс кој врши прекин на оштетената верига од двете страни на лезијата. Потоа, олигонуклеотидот се отстранува под дејство на DNA хеликаза. Формираната празнина од отстранетиот нуклеотид се обновува под дејство на DNA полимераза δ или ϵ , а ензимот DNA лигаза врши спојување на прекините на веригите (Сл. 1.14). Овој механизам на репарација бил идентификуван кај растенијата. Исто така, идентификувани се мутантни растенија кои не поседуваат механизам за DNA репарација кој е независен од светлината. Овие мутации се локализирани во гени кои се хомологни на хуманите гени кои се одговорни за репарација со ексцизија на нуклеотид. Овие истражувања покажуваат дека растенијата користат ист механизам за репарација на DNA како и другите еукариотски организми.

1.3.4 Репарацијата на погрешно спарување ги коригира грешките за време на репликација на DNA

Кај *E. coli*, метилацијата на аденинските остатоци во палиндромската секвенца GATC настанува веднаш по репликацијата на DNA. Ако DNA полимеразата направи грешка за време на DNA репликацијата како што е погрешно базно спарување, тогаш репарацијата настанува пред метилација на новосинтезираната DNA-верига со цел да се разликуваат двете вериги (Сл. 1.15).



Слика 1.15 Механизам на репарација на погрешно спарување кај *Escherichia coli*. Комплекс од три протеини (MutH, MutL и MutS) врши препознавање на погрешно спарените азотни бази кои се интродуцирани од страна на DNA полимеразата во новосинтезираната и неметилираната верига на DNA. Притоа, MutH врши прекин на новата DNA-верига од спротивната страна на метилираното место. Потоа, оштетениот DNA-фрагмент се отстранува со комбинирано дејство на ензимите хеликаза и егзонуклеаза. Формираната празнина се обновува под дејство на DNA полимераза и DNA лигаза (Buchanan и сор., 2015).

Овој тип на репарација се одвива со посредство на комплекс од три протеини (MutS, MutH и MutL). Имено, протеинот MutS ја препознава погрешно спарената база и се врзува за неа, MutH се врзува за хемиметилираните GATC-места од DNA и ја сече неметилираната (новосинтетизирана) верига, додека пак, MutL е поврзан за MutS и MutH и овој протеин е неопходен за крајниот чекор од репарацијата. При овој процес на репарација учествуваат и дополнителни протеини, како што се UvrD хеликазата и егзонуклеаза кои вршат отстранување на оштетената DNA-верига почнувајќи од пресеченото место од страна на протеинот MutH. Формираната празнина се обновува под дејство на DNA полимеразата и DNA лигаза.

Репарацијата на погрешно спарување (Mismatch repair) е високо конзервиран механизам кој функционира на сличен начин кај еукариотите и бактериите. Неколку хомолози на бактериски *mutS* и *mutL* гени биле идентификувани во геномите на квасци и цицачи, додека пак, хомологот на *mutS* генот е присутен и во митохондриска DNA кај хуманата популација. Механизмите на разликување на оригиналните од новосинтетизираните вериги на DNA од страна на бактерискиот MutS-MutL-MutH комплекс не се потврдени кај еукариотите, бидејќи кај овие организми не била детектирана метилација на GATC-секвенцата и не се идентификувани хомоложни гени на *mutH*. Овие податоци покажуваат дека еукариотските гени кои се хомоложни на *mutS* и *mutL* потекнуваат пред еволуционата дивергенција на животните, растенијата и фунгите. Исто така, хомолозите на овие два гена биле клонирани од растенијата, што покажува дека овој систем на репарација на погрешно спарување е сличен кај сите еукариотски клетки.

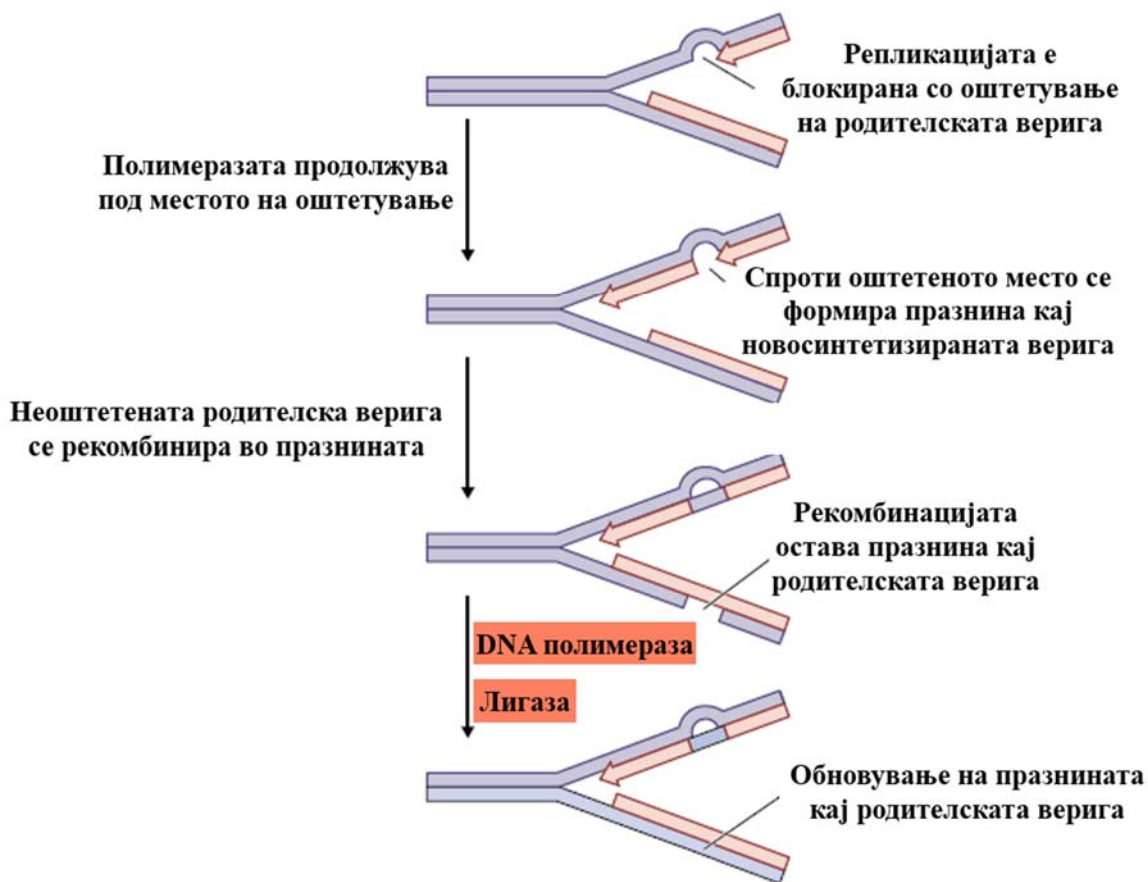
1.3.5 Репарациите склони на правење грешки (Error-prone repairs) овозможуваат DNA полимеразата да чита преку оштетените места на DNA-урнекот

За време на репликацијата на DNA, комплексот на DNA-полимераза може да препознае оштетувања на урнек-веригата на DNA. Притоа, овој ензимски комплекс минува преку оштетените места и ја продолжува синтезата на DNA без да го поправи оштетувањето. Оваа активност на DNA полимеразата претставува потенцијално мутаген процес, бидејќи ензимскиот комплекс инсертира аденински нуклеотиди на оштетеното место независно од оригиналната DNA-секвенца.

Кај бактериите експонирани на летални услови (висок интензитет на UV зрачење) се активира **репаративен механизам склон на правење грешки (error-prone repairs)** уште познат како **транслезиска репликација (translesion replication)**. Кај *E. coli*, протеините UmuC и UmuD се врзуваат за DNA-полимеразата и ја зголемуваат нејзината точност при инкорпорација на нуклеотиди. Според овој механизам, на местото на оштетување од новосинтетизираната верига се инсертираат аденински остатоци независно од секвенцата на родителската DNA-верига. Ако оштетените места се тимидински димери, тогаш не настанува мутација на новосинтетизираната DNA, додека пак, цитозинските димери предизвикуваат мутации на местата на оштетување. И покрај тоа што репаративниот механизам склон на правење грешки може да предизвика голем број на мутации, овој механизам овозможува преживување на клетките во услови на интензивно оштетување на DNA. Сличен механизам на репарација преку бајпас на местата на оштетување е идентификуван кај квасците. Производите на фамилијата на *umiC*-гените кои се неопходни за бајпас на димерите се активни протеини при репаративниот механизам склон на правење грешки, како и високо прецизниот механизам за репарација на оштетена DNA. Кај растенијата е идентификуван хомолог на еден ген од *umiC*-генската фамилија.

1.3.6 Големите оштетувања на DNA можат да се репарираат преку хомологна рекомбинација

Големите оштетувања на DNA можат да индуцираат алтернативен механизам на репарација. При репарација со рекомбинација (Сл. 1.16), DNA полимеразата ја прекинува репликацијата поради оштетувањето на урнек-веригата од DNA. Притоа, репликацијата на DNA продолжува од наредното место на прајмерот од урнекот, што може да биде неколку стотина нуклеотиди низводно од местото на оштетување. Овој дисконтинуитет во репликацијата или формираната празнина кај новосинтезираната верига се обновува преку хомологна DNA рекомбинација со комплементарната родителска верига. и со користење на специфични рекомбинациски ензими. Потоа, ензимите DNA полимераза и DNA лигаза ја репарираат формираната празнина кај комплементарната урнек-верига.



Слика 1.16 Механизам на пост-репликациска репарација. Кога системот на DNA-репликација ќе препознае нерепарирана лезија (пиримидински димер), DNA полимеразата може да го заобиколи оштетувањето и повторно да продолжи под местото на оштетување. Формираната празнина во новосинтезираната верига на DNA се репарира преку рекомбинација со интактната родителска верига. Притоа, ензимите DNA полимераза и DNA лигаза ја обновуваат формираната празнина кај интактната родителска верига на DNA. Подоцна, пиримидинскиот димер може да се отстрани преку репарација со ексцизија за да се формираат две интактни двојноверижни молекули на DNA (Buchanan и сор., 2015).

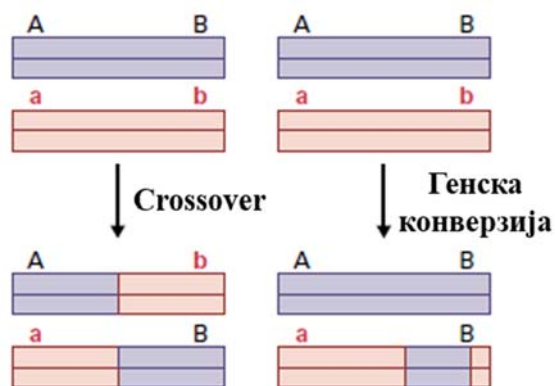
1.4 Рекомбинација на DNA

1.4.1 Рекомбинацијата на DNA има важна улога во мејотската клеточна делба и еволуцијата

Репликацијата и репарацијата на DNA се критични процеси за генетската стабилност кај организмите. Сепак, преживувањето на еден вид зависи од генетската варијација која овозможува адаптирање на видовите кон промените на условите во животната средина. **Генетската рекомбинација** на DNA има важна улога во еволуцијата, бидејќи овој процес овозможува реаранжирање на DNA-секвенци за да се добијат нови комбинации на DNA молекули. Новодобиените гени можат да експресираат нови типови на RNA молекули и протеини и на таков начин се добиваат нови фенотипови. Исто така, рекомбинацијата на DNA за време на мејозата може да овозможи формирање на генетски различни гамети. На таков начин се стимулира продукција на хетерогени генотипови врз кои делуваат факторите на животната средина преку процесот на природна селекција. Механизмите на генетска рекомбинација се тесно поврзани со репликација и репарација на DNA. Всушност, рекомбинацијата на DNA се одвива кај сите класи на живи организми, како и кај вирусите.

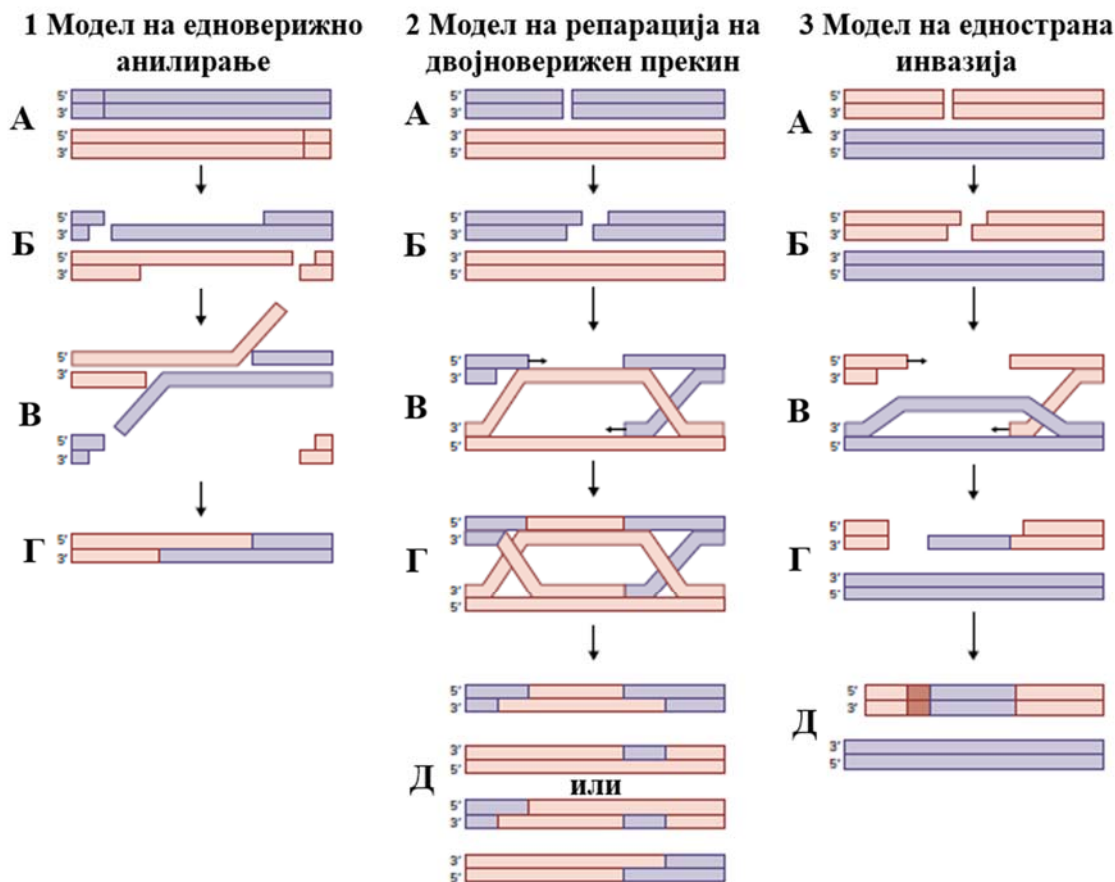
1.4.2 Хомологната рекомбинација се одвива помеѓу долги и хомологни нуклеотидни секвенци

Постојат три типа на механизми на DNA-рекомбинација: хомологна рекомбинација, рекомбинација специфична за позиција и неправилна рекомбинација. **Хомологната рекомбинација** се одвива со DNA секвенци кои имаат значајно слични региони (хомологни региони). Фреквенцијата на рекомбинација се зголемува со должината на хомологните DNA сегменти. Механизмите на хомологната рекомбинација можат да се одредат според структурата на добиените производи (Сл. 1.17). Размената на DNA-секвенци со помош на **кросинг-овер (crossover)** кога не се губи ниту една кодирана информација од двата DNA-дуплекси се нарекува реципрочна рекомбинација. При нераципрочна рекомбинација или **генска конверзија** не настанува размена на секвенци, бидејќи само едниот DNA дуплекс донира информација преку секвенцата.



Слика 1.17 Два типа на хомологна DNA-рекомбинација даваат различни производи (Buchanan и сор., 2015). Кросинг-оверот помеѓу две двојноверижни DNA молекули овозможува реципрочна размена на DNA секвенци (лев панел). Генската конверзија опфаќа нераципрочен трансфер на нуклеотидна секвенца од еден на друг двојноверижен DNA молекул. Донорната секвенца (виолетова боја) останува непроменета, додека пак, акцепторната секвенца (розова боја) ја губи генетската информација (десен панел).

Постојат три модели на хомологна рекомбинација: анилирање на единични вериги, репарација на двојноверижен прекин, како и еднострана инвазија преку кои се објаснуваат потенцијалните производи на специфичната рекомбинација на DNA (Сл. 1.18).

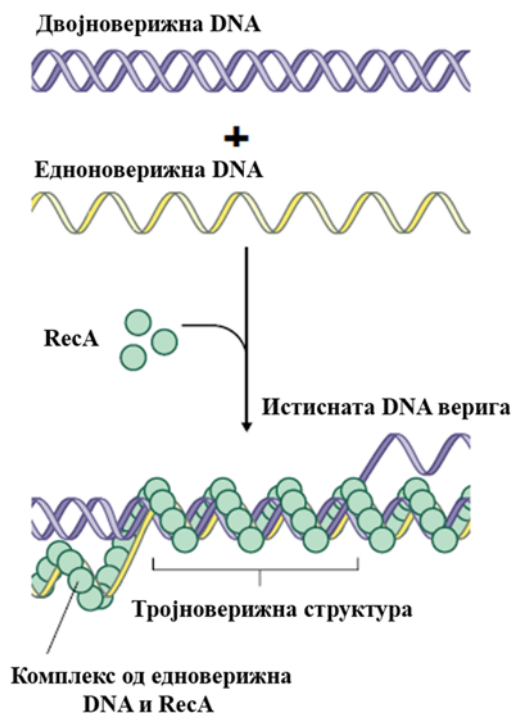


Слика 1.18 Три модели на хомологна рекомбинација (Buchanan и сор., 2015). Донорната DNA е со виолетова боја, додека пак, реципиентната DNA е со розова боја. Кај моделот на едноверижно анилирање (1) настанува двојноверижен прекин кај двата DNA-дуплекси (А). Егзонуклеазите вршат отстранување на нуклеотиди започнувајќи од двојноверижните прекини и на таков начин се експонираат едноверижни хомологни региони (Б). Комплементарните едноверижни синцири на DNA меѓусебно се анилираат (В), што е проследено со отстранување на нехомологните DNA протрузии и репарација на празнините (Г). Овој механизам на рекомбинација е неконзервативен, бидејќи само еден химерен DNA-дуплекс може да опстане. Кај моделот на репарација на двојноверижен прекин (double-strand break repair-DSBR) (2), рекомбинацијата започнува со двојноверижен прекин кај едниот од двата DNA-дуплекси (А). Двојноверижниот прекин се зголемува под дејство на егзонуклеази (Б), а формираните 3'-протрузии на DNA се врзуваат за комплементарните секвенци на другиот дуплекс и делуваат како прајмери за синтеза на DNA (В). Формираните празнини се обновуваат со користење на интактната донорна-DNA како урнек (Г). Разгранетите DNA молекули кои се добиваат од овој процес можат да се комплетираат според една од двете можни комбинации (Д). Овој процес на DSBR е конзервативен механизам на рекомбинација, бидејќи се обновуваат двата DNA-дуплекси кои учествуваат во процесот на рекомбинација. Кај моделот на еднострана инвазија (3), двојноверижното прекинување во акцепторната DNA (А) се зголемува под дејство на егзонуклеази (Б). Едниот од двата формирани 3'-краеви врши инвазија на комплементарната секвенца од интактниот DNA-дуплекс (В). Всушност, синтезата на DNA ја продолжува веригата која врши инвазија. (Г) Неправилната рекомбинација се јавува спротиводно од двојноверижниот прекин и настанува генска конверзија (Д).

Уште пред илјадници години, луѓето вршеле селекција на особини од интерес кај голем број култури на растенија преку процесот на хомологна рекомбинација. Неодамнешниот развој на молекуларната биологија и технологиите за добивање на трансгени растенија има значаен придонес во објаснување на мејотската и соматската рекомбинација на DNA кај растенијата. Всушност, моделот на репарација на двојноверижни вериги на DNA (Сл. 1.18) може да ги објасни процесите што се одвиваат кај растенијата при мејотската делба на клетките. Моделот на анилирање на единичен синцир (Сл. 1.18) најдобро ја опишува екстрахромозомската рекомбинација која се одвива со ниска фреквенција кај соматските растителни клетки. При овој процес, плазмидните DNA молекули кои содржат преклопувачки региони на специфичен ген-репортер се пренесуваат и рекомбинираат во растителната клетка за да се одржи интактната на генот-репортер. Природните екстрахромозомските DNA молекули, како што е мобилната DNA (T-DNA) од *Agrobacterium tumefaciens* или вирусните DNA покажуваат сличен начин на рекомбинација.

1.4.3 Кај растенијата се идентификувани протеини кои се вклучени во хомологна рекомбинација

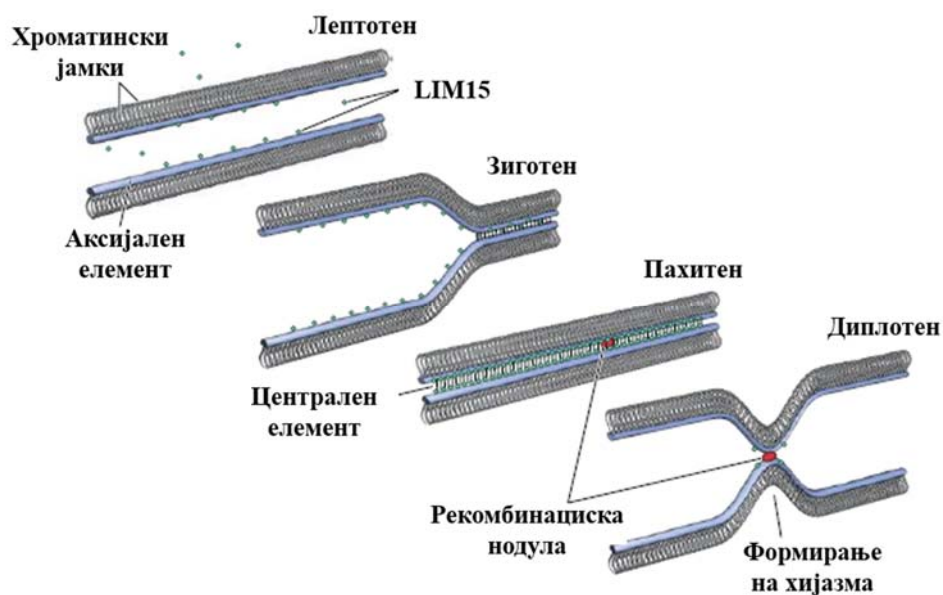
Хомологната рекомбинација кај мејотските и митотските клетки се одвива со посредство на голем број генски производи. Од овие генски производи, кај квасците биле карактеризирани протеините RAD51 и DMC1. Имено, RAD51 е неопходен за митотските и мејотските рекомбинации, додека пак, DMC1 е активен протеин само за време на мејозата. Овие протеини се хомоложни на протеинот RecA кај *E. coli*, кој има главна улога за време на хомологната рекомбинација кај бактериите. Протеинот RecA катализира реакција на пренесување на верига, при што се овозможува навлегување на едноверижна DNA во хомологен регион на DNA-дуплекс (Сл. 1.19).



Слика 1.19 Улога на RecA при трансфер на DNA-верига. Протеинот RecA кај *Escherichia coli* претставува мономер со големина од 38-kDa кој се врзува за едноверижна DNA преку кооперативен механизам. Формираниот нуклеопротеински комплекс се агрегира со двојноверижна DNA-молекул, при што се добива тројноверижна DNA-комплекс во кој нуклеотидните бази не се спарени. Овој комплекс го олеснува навлегувањето на едноверижна DNA, како и комплементарното спарување на базите за да настане натамошната размена на вериги (Buchanan и соp., 2015).

Исто така, протеините RAD51 и DMC1 катализираат пренесување на синцир во присуство на репликацискиот протеин A (RP-A), кој се врзува за единичен DNA-молекул. Оваа активност е неопходна за пренесување на верига при сите три модели на хомологна рекомбинација (Сл. 1.18).

Кај растенијата се идентификувани голем број хомологни гени на *recA*, а дел од овие гени кодираат протеини кои имаат функција во хлоропластите. Исто така, хомолози на генот *RAD51* се клонирани кај некои растенија, како *Lilium*, *Arabidopsis*, ориз (*Oryza sativa*), пченица (*Triticum* spp.) и пченка (*Zea mays*). Експресијата на овие гени била активирана по третман на растенијата со X-зраци, што покажува дека соматската рекомбинација на DNA се индуцира при оштетувања на DNA. Растителните протеини кои се хомологни на RecA или RAD51 најверојатно имаат значајна улога при хомологната рекомбинација. Кај *Arabidopsis* е изолирана cDNA секвенца која е хомологна на *DMC1*. Протеините DCM1 и RAD51 се колокализирани при одредени стадиуми од мејозата кај *Lilium*. Всушност, овие протеини можат да делуваат на кооперативен начин при порамнувањето и спарувањето на комплементарните DNA синцири за време на хомологната рекомбинација. Двата протеина се прикрепуваат за хроматинските јамки за време на лептотен и зиготен од мејозата, а за време на пахитен се поврзани за синаптонемалниот комплекс (Сл. 1.20).

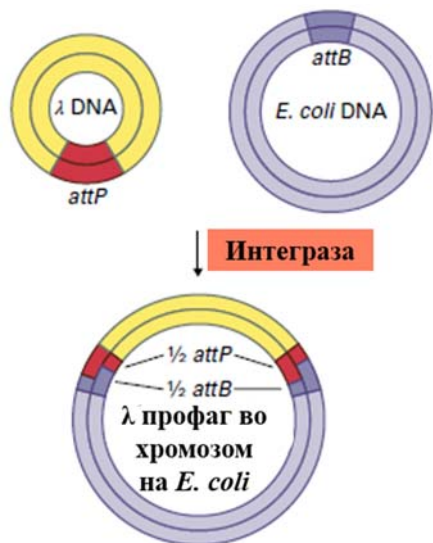


Слика 1.20 Протеинот LIM15 кај *Lilium* учествува во формирање на синаптонемален комплекс за време на мејоза. Синаптонемалниот комплекс обезбедува структурна рамка за одвивање на рекомбинацијата со посредство на протеинските комплекси во рекомбинациската нодула (Buchanan и сор., 2015).

1.4.4 Рекомбинацијата специфична за позиција опфаќа активност на ензими и дефинирани DNA-локуси

Вториот механизам на размена на DNA секвенци кај *E. coli* е **рекомбинација специфична за позиција (site-specific recombination)**, која се одвива на специфични генски локуси. Овој процес се одвива независно од RecA и не се потребни долги региони на хомологна DNA за рекомбинација. Рекомбинацијата специфична за позиција е најдобро проучена при

интеграција на бактериофагот λ во хромозомот на *E. coli*. За интеграција на бактериофагот λ во бактерискиот хромозом неопходно е присуство на два протеини и заедничка DNA секвенца. Едниот протеин го кодира бактериофагот и поседува активност на рекомбиназа (интеграза), додека пак, вториот протеин на клетката домаќин кодира DNA врзувачки протеин (IHf). Заедничката DNA секвенца е 31-бр палиндром, кој е присутен во фагната DNA и хромозомот на клетката домаќин (Сл. 1.21).



Слика 1.21 Интеграција на бактериофагот λ во хромозомот на *Escherichia coli* вклучува рекомбинација која е специфична за позиција помеѓу *attP*-секвенцата од геномот на бактериофагот и *attB*-секвенцата од бактерискиот геном. Рекомбинацијата се катализира под дејство на ензимот интеграза (Buchanan и сор., 2015).

Исто така, рекомбинацијата специфична за позиција се одвива кај еукариотските организми. Така на пр., 2 μ плазмид од квасец кодира специфична рекомбиназа позната како флипаза (FLP) која е неопходна за рекомбинација специфична за инвертирани репетитивни секвенци при репликацијата на DNA. Рearанжманот на гените за имуноглобулини кај мамалиски В и Т клетки потекнува од рекомбинација специфична за одредена позиција. Во јадрото на растителните клетки не е идентификуван процес на рекомбинација специфична за одредена позиција. Сепак, овој процес има важна улога при репликација на пластидната DNA и rearанжманот на митохондријалниот геном кај растенијата.

1.4.5 Неправилната рекомбинација може да се одвива без присуство на долги сегменти на хомологни DNA секвенци

Третиот механизам на рекомбинација, кој не ги опфаќа претходните два типа на размена на DNA секвенци се нарекува **неправилна рекомбинација**. Предложените модели на овој тип на рекомбинација опфаќаат кратки секвенци на хомологна DNA или воопшто не е потребна хомологија во DNA секвенците. Кај *E. coli* се карактеризирани два механизми на неправилна рекомбинација. Првиот механизам е зависен од хомологијата во DNA секвенците и се одвива со посредство на RNA полимеразата, додека пак, вториот механизам е независен од присуството на хомологни секвенци DNA и се одвива под дејство на DNA гираза (топоизомераза II). Неправилната рекомбинација не претставува карактеристичен механизам на размена на DNA секвенци кај квасците. Сепак, кај оваа група на организми се идентификувани неколку генски производи кои учествуваат во овој тип на DNA-рекомбинација.

Често пати, кај растенијата се забележуваат голем број производи на рекомбинација кои не можат да се објаснат со типична хомологна рекомбинација на DNA кај мејотски или соматски клетки. Моделите на неправилна рекомбинација можат да се користат за да се објаснат овие нови производи на DNA-рекомбинација. Според оваа хипотеза, неправилната рекомбинација кај растителните геноми е повеќе застапена во споредба со хомологната рекомбинација. Така на пр., интеграцијата и ексцизијата на транспозонски DNA елементи, како и инсерцијата на T-DNA од *Agrobacterium tumefaciens* во растителните хромозоми се одвива без значајна хомологија во DNA секвенците. Според тоа, овие процеси кај растенијата најверојатно се одвиваат преку неправилна рекомбинација.

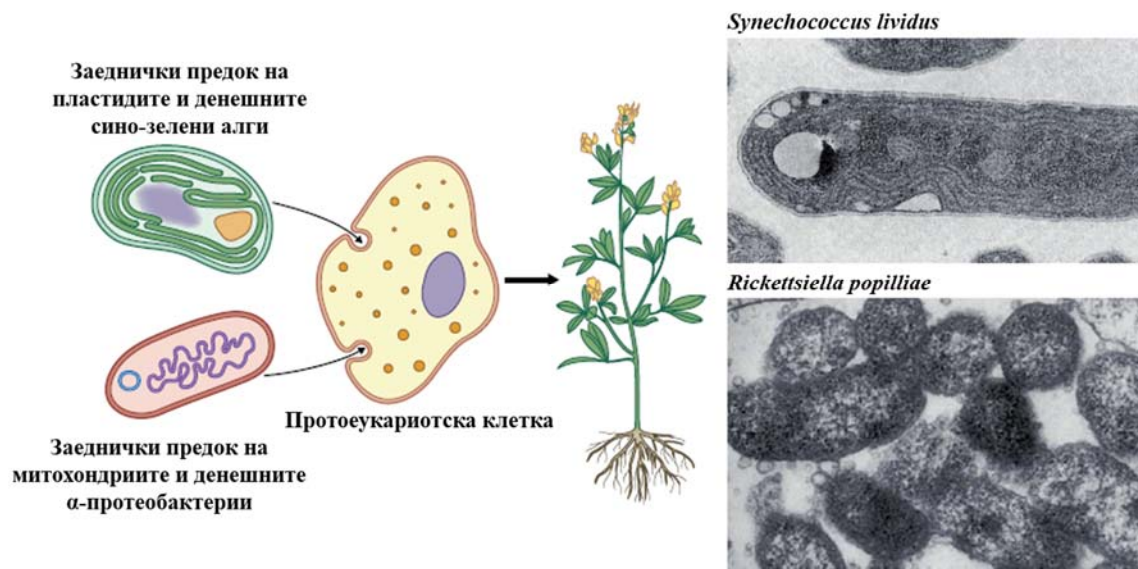
1.5 DNA од клеточни органели

Еукариотските клетки се разликуваат од прокариотските клетки поради присуството на специфични субклеточни органели, како што се митохондриите (присутни кај речиси сите еукариоти) и пластидите (присутни само кај растенијата и алгите). Пластидите учествуваат во различни анаболички реакции кои вклучуваат фотосинтетска редукција на јаглерод, синтеза на аминокиселини и продукција на масни киселини. Митохондриите кај растителните клетки се специјализирани компартмани за одвивање на клеточната респирација и во координација со другите клеточни органели учествуваат во процесите на фотореспирација и глуконеогенеза.

Пластидите и митохондриите се уникатни клеточни органели кај еукариотите бидејќи поседуваат сопствен генетски материјал и комплетен систем за синтеза на протеини. Кај различни таксони од алги и растенија, овие органели се пренесуваат исклучиво од едниот родител (унипарентално наследување). Голем дел од молекуларните истражувања на пластидите и митохондриите кај растителните клетки биле насочени кон проучување на структурата и функцијата на геномите кај овие органели. Познато е дека геномите на пластидите и митохондриите кодираат мал број гени за протеини кои функционираат во органелите, како и различни компоненти за одржување на нивниот сопствен генетски систем. Експресијата на геномите од клеточните органели е под строга контрола од страна на јадрениот геном. Сепак, еволуцијата на регулаторните механизми кај растенијата овозможува координирана експресија на јадрените, пластидните и митохондриските гени за синтеза на протеини кои функционираат во цитоплазматските органели.

1.5.1 Хлоропластите и митохондриите еволутивно потекнуваат од ендосимбионтски бактерии

Пластидите и митохондриите имаат голем број заеднички карактеристики со прокариотските организми. Така на пр., геномите на клеточните органели имаат сличен тип на организација со бактериските геноми. На сличен начин, фотосинтезата во хлоропластите на растенијата се одвива на идентичен начин како и кај цијанобактериите. Компарацијата на секвенците од рибозомалната RNA (rRNA) кај органелите и некои прокариотски организми укажува на фактот дека пластидите имаат заеднички предок со денешните цијанобактерии, а митохондриите со денешните протеобактерии. Според оваа **ендосимбионтска хипотеза**, хлоропластите и митохондриите потекнуваат од прокариотите кои биле инкорпорирани од страна на протоеукариотски клетки за време на еволуцијата на еукариотите (Сл. 1.22).



Слика 1.22 Еукариотските организми еволуирале од ендосимбиоза помеѓу различни прокариотски организми. Компарацијата на рибозомалните секвенци на RNA (rRNA) покажуваат дека пластидите кај растенијата имаат заеднички предок со денешните цијанобактерии како што е *Synechococcus lividus*. Митохондријалните rRNA-секвенци од денешните еукариоти се хомоложни со претставниците на α -протеобактерии, кои вклучуваат неколку родови на интрацелуларни паразити (*Agrobacterium*, *Rhizobium* и *Rickettsia*). Електронската микрографија ги прикажува клетките од *Rickettsiella popilliae* во крвните клетки на домаќинот-инсект (Madigan и соp., 1997).

Денешните симбиози помеѓу фотосинтетски организми и нефотосинтетски домаќини претставуваат дополнителна потврда за ендосимбионтската хипотеза. Така на пр., бифлагелатниот протист *Cyanophora paradoxa* воспоставува ендосимбиоза со цијанобактеријата наречена цијанела, која функционира како хлоропласт и обезбедува фотосинтетска редукција на јаглерод за клетката-домаќин. Друг пример се морските голи полжави кои се хранат со алги и можат да ги инкорпорираат алгалните хлоропласти во сопствените ткива за да обезбедат храна преку фотосинтезата. Сите овие примери покажуваат дека ендосимбионтските интеракции имаат значаен придонес во развитокот на фотосинтетски еукариоти толерантни на кислород.

Хлоропластите и митохондриите од денешните организми не можат да егзистираат автономно и надвор од еукариотска клетка. За време на еволуцијата, голем дел од DNA која што егзистирала во клеточните органели била пренесена во јадрениот геном. Овој процес на генски трансфер помеѓу клеточните органели и јадрото се одвива и кај денешните еукариотски организми. Некои DNA-секвенци од органелите се слични со **опероните** на прокариотите, бидејќи овие гени (кодираат протеини со функција во заеднички метаболички пат или учествуваат во асемблирање на комплекс) се групирани заедно. Одредени секвенци од пластидниот геном се слични со соодветните оперони кај цијанобактериите, како што се некои регулаторни елементи, генски кластери (пр. *rpl23* оперон) и гените за субединицата на АТРаза (*atp*). Сепак, некои транскрипциски и пост-транслационски регулаторни фактори кај растителните органели се уникатни и не покажуваат корелација со бактериите.

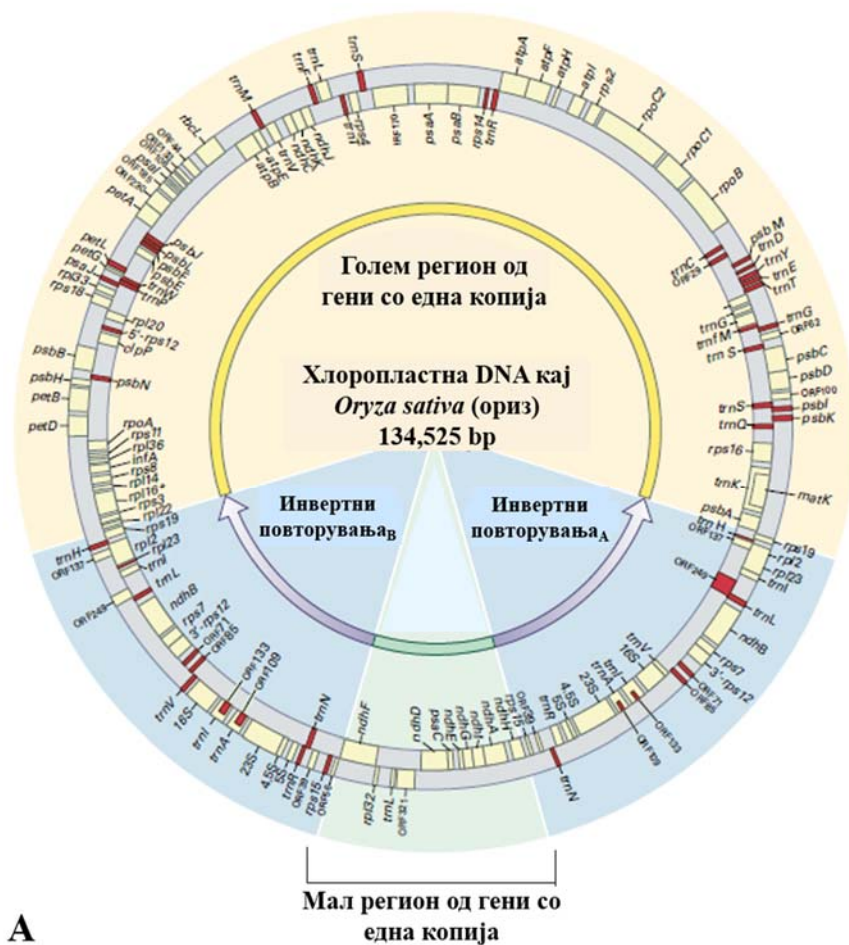
1.5.2 Структурата на геномот на пластидите е конзервирана меѓу растенијата

Пластидниот геном е составен од единичен, циркуларен хромозом од двојноверижна DNA која опфаќа 4 сегменти (Сл. 1.23А): голем регион од гени со една копија (large region single-copy genes-LSC), мал регион од гени со една копија (small region of single-copy genes-SSC) и две копии на инвертни репетитивни секвенци кои ги одвојуваат регионите од гени со една копија (IR_A и IR_B, соодветно). Пластидната DNA е хомогена во рамки на растителниот вид. Сепак, пластидната DNA која содржи IR региони се состои од две групи на молекули, кои се разликуваат според ориентација на регионите од гени со една копија. Познато е дека сите соматски клетки во организмот поседуваат ист сет на јадрени гени, кои можат да ги експресираат овие гени во различни комбинации. На сличен начин, сите пластиди кај еден растителен организам содржат идентичен наследен материјал, меѓутоа овие органели можат да се разликуваат според правецот на развиток и метаболичката активност.

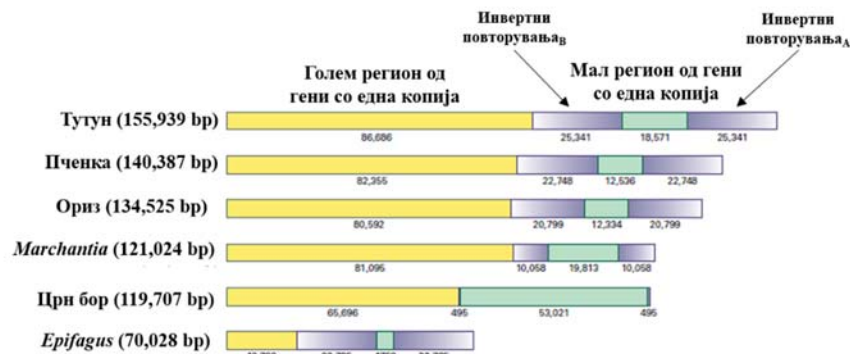
Пластидната DNA значајно варира во должина кај различни видови на растенија и алги. Така на пр., едноклеточната алга *Bigeloviella natans* од класата Chlorarachniophyta има најмал платиден геном (69 kb) помеѓу фотосинтетските еукариотски организми. Од друга страна пак, хлоропластниот геном кај зелената алга *Floydiella terrestris* од класата Chlorophyceae изнесува 521 kb. Повеќето пластидни геноми кај растенијата, вклучувајќи ги геномите на тутун, пченка, ориз и *Marchantia* имаат големина од 120 до 160 kb и се карактеризираат со сличен тип на организација на гени (Сл. 1.23Б). Варијацијата во големината на пластидните геноми кај терестричните растенија се должи на промените во должината на IR-регионите, кои варираат од 0,5 до 76 kb. Повеќето скриеносемени растенија содржат IR-региони, додека пак, пластидните геноми кај некои легуминозни растенија, голосемени растенија и алги не поседуваат инвертни репетитивни секвенци. Овие IR-региони најверојатно егзистирале во пластидите на заеднички предок на пластидите, а подоцна биле изгубени за време на еволуцијата кај некои легуминозни растенија и голосемени растенија.

1.5.3 Пластидите содржат генски производи кои се кодираат од пластидите и јадрото

Денес се достапни комплетните секвенци на хлоропластните геноми кај повеќе од 200 растителни видови (пр. тутун, пченка, ориз и бор), како и митохондријалните геноми кај повеќе од 12 растителни видови. Повеќето пластидни DNA молекули го содржат целиот комплемент на гени за пластидните rRNA и tRNA молекули. Сепак, пластидниот геном опфаќа околу 100 гени во една копија и најчесто кодираат протеини кои се неопходни за фотосинтетските функции на клетката (Табела 1.2). Повеќето протеини кои се кодирани од пластидните гени имаат позната функција, иако постојат уште неколку отворени рамки на читање (ORF) во пластидниот геном со непозната функција. Развитокот на технологијата за трансформација на хлоропластите кај тутун (*Nicotiana tabacum*) и алгата *Chlamydomonas* претставува ефикасен пристап за проучување на функцијата на пластидните гени. Нефотосинтетските растенија (пр., *Rhizanthella gardneri*) имаат мали пластидни геноми (50-73 kb), бидејќи во текот на еволуцијата ги изгубиле повеќето гени кои се неопходни за фотосинтезата. Од друга страна пак, пластидните геноми кај алгите се поголеми во споредба со растенијата, поради присуството на дополнителни гени кои не се идентификувани во пластидите на растенијата. Така на пр., црвената алга *Porphyrа purpurea* содржи 70 кодирачки пластидни гени, а кај растенијата овие гени се потврдени во јадрениот геном.



А



Б

Слика 1.23 (А) Мапа на хлоропластен геном кај ориз (*Oryza sativa*) како модел за организација на пластидните гени кај скриеносемените растенија. (Б) Шематски приказ на пластидните геноми кај некои растенија ги прикажува конзервираниите секвенци: два региони на гени со една копија и две инвертни повторувања (IR). Должината на IR може значајно да варира помеѓу пластидните геноми кај различни видови. Регионите со една копија на гени во пластидниот геном кај нефотосинтетскиот паразитски вид *Epifagus* имаат релативно мала должина, бидејќи се елиминирани повеќето гени кои кодираат фотосинтетски протеини. Бројот за секој DNA сегмент ја означува неговата должина во базни парови (Buchanan и сор., 2015).

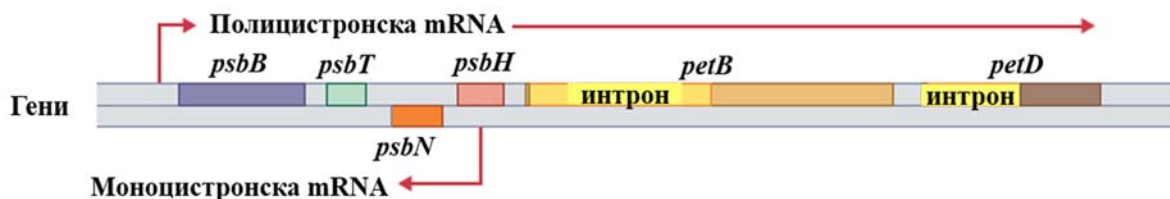
Табела 1.2 Идентификувани гени во пластиден геном.

Генски производ	Кратенка на гени	Растенија		Алги	
		Фотосинтетски растенија	<i>Epifagus</i> ¹	<i>Euglena</i>	<i>Porphyra</i> ²
Број на гени		101-150	40	82	182
Генетски систем					
rRNA	<i>rrn</i>	4	4	3	3
tRNA	<i>trn</i>	30-32	17	27	35
Рибозомски протеин	<i>rps, rpl</i>	20-21	15	21	46
Други производи		5-6	2	4	18
Фотосинтеза					
Rubisco и тилакоиден мембрански систем	<i>rbcL, psa, psb, pet, atp</i>	29-30	0	26	40
NADH дехидрогеназа	<i>ndh</i>	11	0	0	0
Биосинтеза и други функции		1-5	2	1	40
Број на интрони		18-21	6	155	0

¹ *Epifagus* е нефотосинтетски паразитски растителен вид.

² *Porphyra* е црвена алга.

Голем број на гени во пластидниот геном се организирани во **полицистронски транскрипциски единици**, кои претставуваат кластери од два или повеќе гени кои се транскрибираат од страна на RNA-полимераза од единичен промотор (Сл. 1.24). Некои од овие полицистронски гени наликуваат на прокариотските оперони. За разлика од прокариотските оперони, пластидните геноми содржат полицистронски транскрипциски единици кои се составени од функционални различни гени. Сепак, mRNA од гените кои кодираат протеини што се неопходни за време на фотосинтезата можат да се детектираат и кај нефотосинтетските пластиди, како што се амилопластите во корени или хромопластите во плодови од домати. Всушност, овие mRNA молекули не се транслатираат во функционални протеини. Овие истражувања покажуваат дека пост-транскрипциската регулација има значајна улога во регулација на експресијата на пластидните гени.



Слика 1.24 Оперонот *psbB* кај растенијата е карактеристичен модел за организација на пластидните гени во оперони кои се слични со прокариотските геноми. Опероните се транскрибираат во полицистронски mRNA молекули кои кодираат неколку слични генски производи. Во споредба со *psbB*-оперонот, генот *psbN* од спротивниот синџир се транскрибира како моноцистронска mRNA која кодира само еден генски производ (Buchanan и сор., 2015).

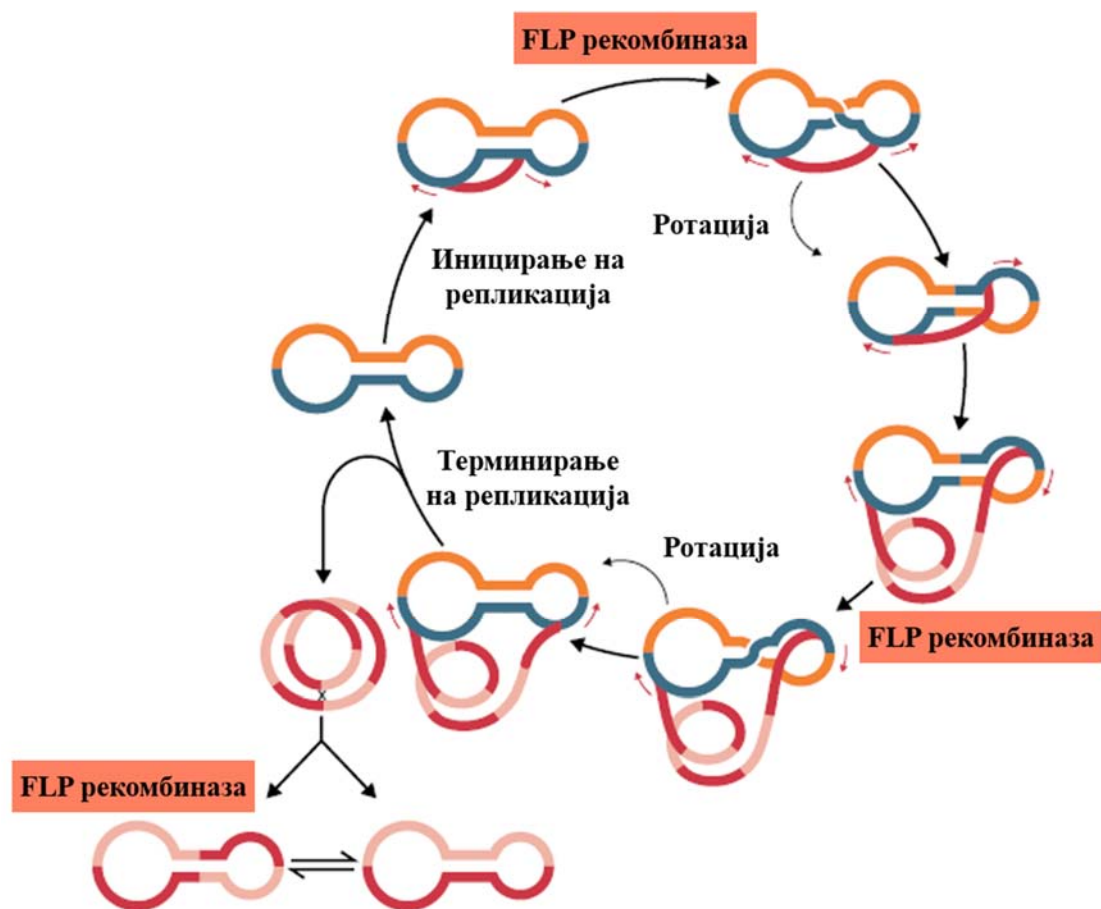
Пластидниот геном кодира неколку RNA-молекули и протеини кои се вклучени во транслација на mRNA од клеточни органели. Сепак, повеќето протеин-кодирачки гени кои се неопходни за одвивање на процесот на фотосинтезата се присутни во јадрениот геном.

Според тоа, голем број на гени кои биле присутни во првобитните форми на пластидите најверојатно преминале во јадрото за време на еволуцијата. Така на пр., ензимот за фиксација на CO₂ при фотосинтезата (рибулоза-1,5-бифосфат карбоксилаза/оксигеназа-Rubisco) е мултипротеински комплекс кој е составен од два типа на субединици. Генот за малата субединица (*RBCS*) е локализиран во јадрото, додека пак, генот за големата субединица (*rbcL*) е присутен во пластидниот геном. Оваа дистрибуција на гени помеѓу јадрените и пластидните геноми е карактеристична особина за протеините кои учествуваат во асемблирање на фотосинтетските протеински комплекси. Така на пр., протеините за фотосистемите I и II, цитохромот *b6f* комплекс, како и пластидната АТФ синтаза се кодираат во јадрените и пластидните геноми. Важно е да се напомене дека во хлоропластите се одвиваат голем број на значајни биохемиски патишта во кои учествуваат ензими кои се кодираат во јадрениот геном, а потоа се транслатираат во цитоплазмата и транспортираат во пластидите.

1.5.4 Механизмот на репликација на пластидната DNA не е доволно проучен

Секој хлоропласт содржи голем број копии (околу 150) на сопствениот циркуларен геном. Сепак, бројот на копии на пластидните геноми може да варира во зависност од стадиумот на развојот и типот на пластидите. Големите број на DNA-молекули во хлоропластите ја потенцира високата потреба на овие клеточни органели за експресија на протеините кои се активни за време на фотосинтезата. Оваа констатација може да се потврди со нискиот број на DNA-молекули во амилопластите на корените, како и нефотосинтетските пластиди. Иако не постојат евидентни податоци за механизмот на репликација на пластидната DNA, познато е дека репликацијата на DNA од клеточните органели се одвива независно од јадрената DNA. Репликацијата на пластидната DNA се регулира преку фреквенцијата на иницијацијата на DNA-репликација која може да биде во синхронизација со клеточниот циклус кај клетките со активна делба или преку независен механизам од клеточниот циклус за време на клеточната диференцијација. Процесот на репликација на пластидната DNA е сличен на моделот на двоен ротирачки круг (double rolling-circle) преку кој се објаснува репликацијата на 2μ плазмидите кај квасецот (Сл. 1.25). Според овој модел, изворите на репликација, како и рекомбинацијата специфична за позиции се локализирани во рамките на долги инвертни репетитивни (IR) секвенци во пластидниот геном.

Електронската микроскопија претставува ефикасна техника за мапирање на изворите на репликација на пластидната DNA кај растенијата. Кај *Oenothera* и тутун (*N. tabacum*), репликацијата на DNA започнува на специфични места во IR-регионите кои се наоѓаат во близина на генот за 16S rRNA. Кај грашокот (*Pisum sativum*) и *Euglena* кои не поседуваат IR-региони, изворот на репликација е локализиран во близина на гените за rRNA, што покажува дека rRNA оперонот ги задржал DNA секвенците кои стапуваат во интеракција со системот за репликација на DNA за да се иницира репликацијата. Сепак, во хлоропластната DNA кај *Oenothera*, грашок, пченка и тутун биле констатирани т.н. поместувања или D-јамки на повеќе места. Присуството на повеќе од две вакви D-јамки како интермедиерни форми при репликацијата покажува дека еднонасочната синтеза на една нова верига заменува една родителска верига. Според тоа, пластидните геноми можат да содржат и други извори на репликација на DNA покрај оние што се поврзани со rRNA оперонот.

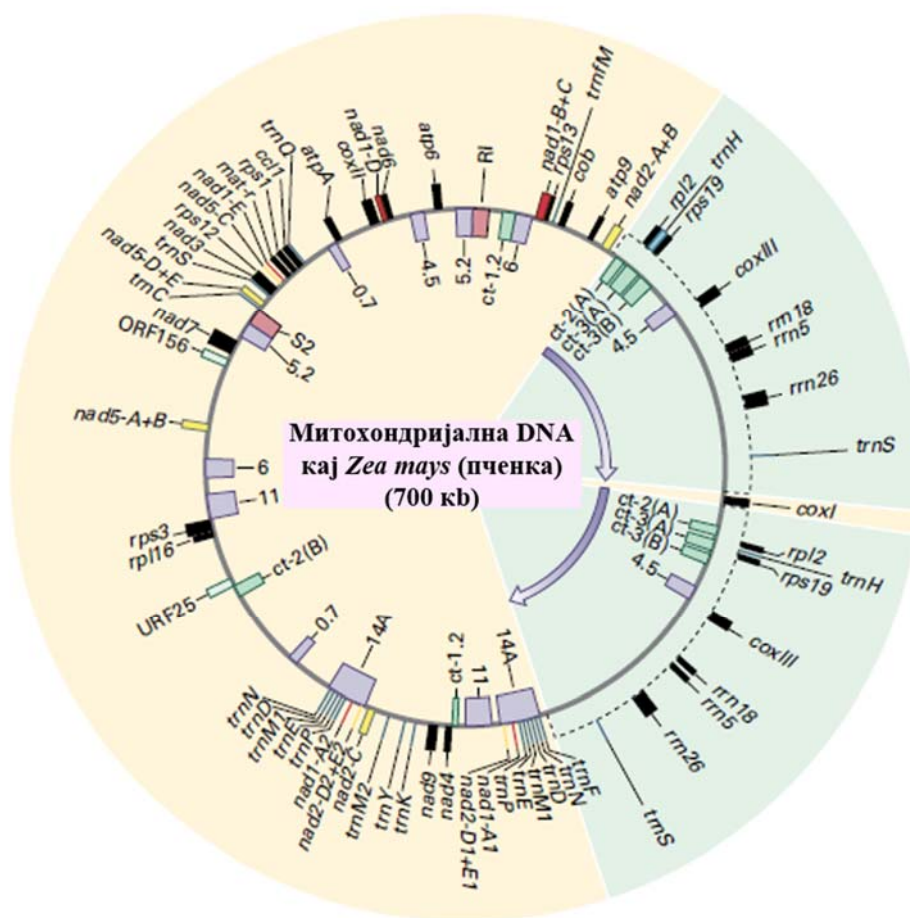


Слика 1.25 Шематски приказ на моделот на двоен ротирачки-круг кој ја прикажува репликацијата на 2μ плазмидот кај квасец, како и репликација на хлоропластна DNA. Малите црвени линии го покажуваат правецот на синтеза на DNA. При овој процес на репликација, единичен настан на иницијација формира две репликациски виљушки со спротивни ориентации. Рекомбинацијата специфична за позиција се катализира под дејство на ензимот FLP рекомбиназа, кој врши реориентирање на репликациските виљушки и се движат во иста ориентација. Вториот настан на рекомбинација ги враќа репликациските виљушки во почетната состојба со спротивни ориентации, при што се овозможува на репликациските виљушки да се сретнат и да настане терминирање на репликацијата. Формираниот производ на репликацијата е долга конкатамерска DNA (DNA молекул со бројни копии на иста DNA секвенца поврзани во серија), од која со посредство на FLP-посредувана рекомбинација се добиваат DNA-мономерни. Овие конкатамерски DNA молекули се идентификувани во пластидите на растителните клетки (Buchanan и сор., 2015).

Анализата на DNA-секвенците кај различни растителни видови покажува дека сите ензими и регулаторни протеини кои се есенцијални за репликација на пластидната DNA се кодираат во јадрениот геном. Специфичните ензими како DNA полимерази, примази, топоизомерази и хеликази биле детектирани во пластидите на растителните клетки, меѓутоа, нивната функција при репликацијата сè уште не е позната. Хлоропластните геноми на *Chlamydomonas* и *Porphyra* имаат хомоложни DNA-секвенци со бактериските гени *dnaA* и *dnaB* кај *E. coli*, кои кодираат протеини за репликација и репарација на DNA. Присуството на овие генски секвенци во хлоропластната DNA покажуваат дека пластидната DNA има слични механизми на репликација како и бактериската DNA кај *E. coli*.

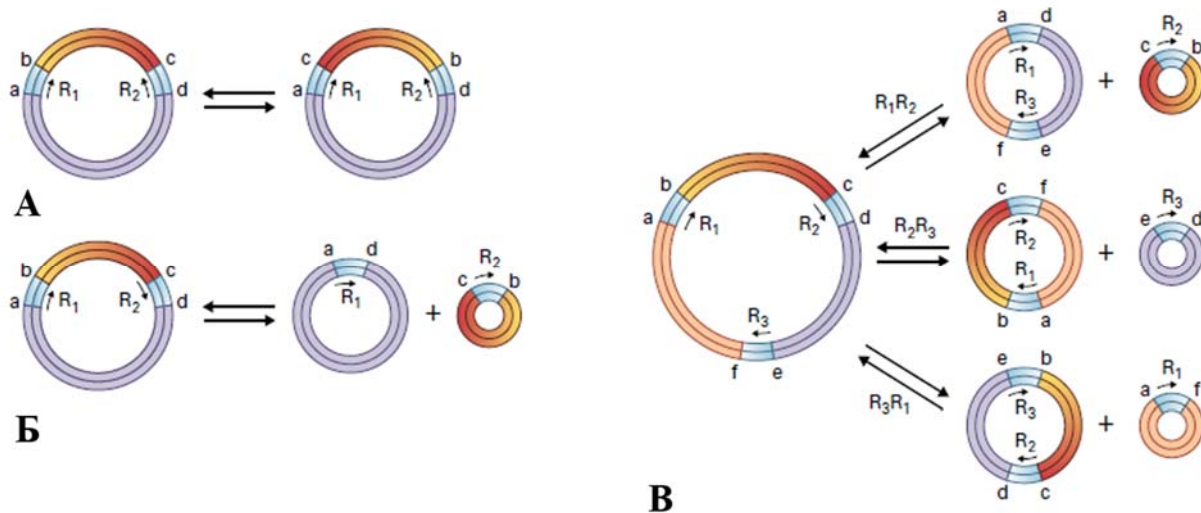
1.5.5 Митохондријалните геноми кај растенијата имаат варијабилна големина и организација

Големината на митохондријалните геноми кај растенијата варира од 200 kb кај *Oenothera* и *Brassica* до преку 10 Mb кај *Silene conica*. Според тоа, митохондријалните геноми кај растителните организми се карактеризираат со висок степен на варијабилност во големината. Оваа варијабилност потекнува од невообичаената акумулација на некодирачки DNA-секвенци во регионите помеѓу гените (Сл. 1.26). Интересен е податокот што јадрениот геном кај *Arabidopsis* има поголем број на генетски информации во споредба со митохондријалниот геном. Всушност, кодирачките региони кај *Arabidopsis* опфаќаат помалку од 10% од 367-kb митохондријаната DNA, додека пак, 60% од јадрениот геном не содржи кодирачки информации. За разлика од некодирачките интергенски DNA региони во јадрениот геном, митохондријалните интергенски региони кај растенијата не се составени од репетитивни DNA-секвенци. Од друга страна пак, анималните митохондријални геноми се компактни (околу 16 kb) и главно не содржат некодирачки интергенски секвенци.



Слика 1.26 Мапата на митохондријалниот геном кај пченка (*Zea mays*) е конструирана врз основа на хипотетичкиот мастер DNA молекул кој ги содржи сите митохондријални гени. Митохондријалната DNA кај пченката содржи само неколку генски секвенци и покрај тоа што е значајно поголема во споредба со хлоропластната DNA. Во процесите на рекомбинација учествуваат неколку инвертни и директни репетитивни DNA секвенци (прикажани со сина, зелена и виолетова боја од внатрешниот круг) за да се добијат мали субгеномски циркуларни DNA молекули (Buchanan и сор., 2015).

Митохондријалните геноми кај растенијата можат да егзистираат како циркуларни DNA-молекули со различна големина. Малите кружни молекули на митохондријална DNA се наречени **субгеномски прстени** и најверојатно потекнуваат од поголем DNA-прстен. Вкупната содржина на DNA-секвенци од субгеномските прстени го претставува целокупниот митохондријален геном. Субгеномските прстени кај митохондријалната DNA од пченка (*Zea mays*) се типичен пример за ваков тип на организација на митохондријалниот геном (Сл. 1.27).



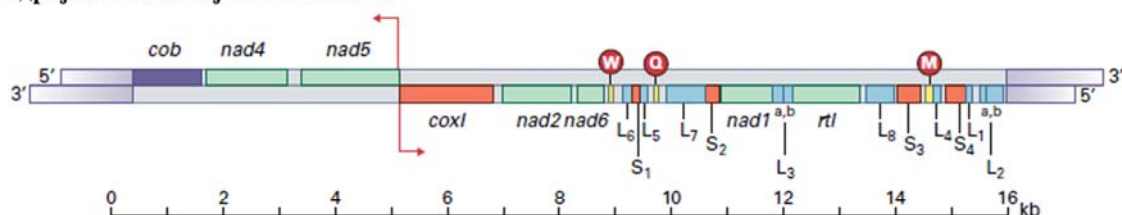
Слика 1.27 Хомологната рекомбинација се јавува кај репетитивни DNA-секвенци во митохондријалниот геном кај растенијата. Репетитивните DNA-секвенци можат да бидат директни или инвертни и нивните ориентации влијаат врз реорганизацијата на геномот како резултат на рекомбинацијата. На сликата се прикажани три хипотетички мастер DNA-прстени, како и нивните субгеномски прстени. (А) Рекомбинацијата помеѓу еден пар на инвертни повторувања овозможува добивање на две изомерни форми на мастер DNA прстен. (Б) Рекомбинацијата на еден пар на директни повторувања овозможува добивање на два субгеномски прстени. (В) Кај мастер прстенот со три копии на директни повторувања можат да се одвиваат три различни настани на рекомбинација. Секој можен настан на рекомбинација продуцира различен пар на субгеномски прстени (Buchanan и сор., 2015).

Најголемиот митохондријален кружен DNA-молекул кај пченката е означен како **мастер прстен (master circle)** и го кодира комплетниот сет на митохондријални гени. Сепак, DNA од мастер прстенот не била изолирана и се смета дека овој голем DNA молекул не постои. Всушност, неколку кратки региони со различни репетитивни DNA-секвенци кои се дистрибуирани низ митохондријалниот геном учествуваат во рекомбинациите за формирање на субгеномските DNA-прстени. Овие директни и инвертни DNA-секвенци најверојатно ги заштитуваат функционалните гени од штетни реаранжирања. Сепак, останува нејасно дали субгеномските DNA-прстени се реплицираат независно и дали овие DNA-прстени можат да се формираат од хипотетичкиот мастер-прстен. Рекомбинацијата и фрагментацијата на митохондријална DNA кај растенијата не е универзален процес, бидејќи линеарните геноми кај *Chlamydomonas* и циркуларните геноми кај *Marchantia* и белиот синап (*Brassica hirta*) се хомогени и не формираат субгеномски DNA-прстени.

1.5.6 Митохондријалниот геном има конзервирана генетска содржина меѓу растителните видови

Едноклеточната зелена алга *Chlamydomonas* е првиот фотосинтетски организам со целосно секвенциониран митохондријален геном (Сл. 1.28). Денес се достапни нуклеотидните секвенци за повеќе од 65 видови на растенија и алги, вклучувајќи ги *Arabidopsis*, *Marchantia*, зелената алга *Prototheca* и црвената алга *Chondrus*.

Митохондријална DNA кај *Chlamydomonas*



Содржина на гени во митохондријална DNA кај *Chlamydomonas*

	Ген	Генски производ
Протенин-кодирачки гени	<i>cob</i>	Апоцитохром
	<i>coxI</i>	Цитохром оксидаза субединица I
	<i>nad1, nad2, nad4, nad5, nad6</i>	Субединици на NADH дехидрогеназа
	<i>rnl</i>	Реверзно-транскриптазна ORF
	L1-L8	Сегменти за голема rRNA субединица
rRNA гени	S1-S4	Сегменти за мала rRNA субединица
tRNA гени	W	Триптофан tRNA
	Q	Глутамин tRNA
	M	Метионин tRNA

Слика 1.28 Митохондриите кај *Chlamydomonas* содржат линеарен DNA-дуплекс со големина од 15,8 kb. Геномот содржи осум гени кои кодираат протенини. Карактеристична особина на митохондријалниот геном е неправилниот распоред на генските сегменти за rRNA. Всушност, rRNA гените за големата субединица (LSU) и малата субединица (SSU) на ензимот Rubisco се дисконтинуирани. Во рамките на регион со големина од 6 kb постојат сегменти за кодирање на rRNA домени кои се испрекинати помеѓу себе, како и со интактни гени за кодирање на протеини и tRNA. Кодирачките сегменти за rRNA се нумерирани од S1 до S4, како и од L1 до L8 според ориентација од 5' кон 3'. Митохондријалната DNA кодира само три гени за tRNA, кои се неопходни за импорт на бројни tRNA молекули од цитоплазмата. Краевите на геномот се карактеризираат со терминални инвертни репетитивни секвенци со едноверижни 3' протрузии. Овие протрузии имаат идентични секвенци и на таков начин се исклучува можноста за циклизација на геномот и формирање на конкатамери (Buchanan и сор., 2015).

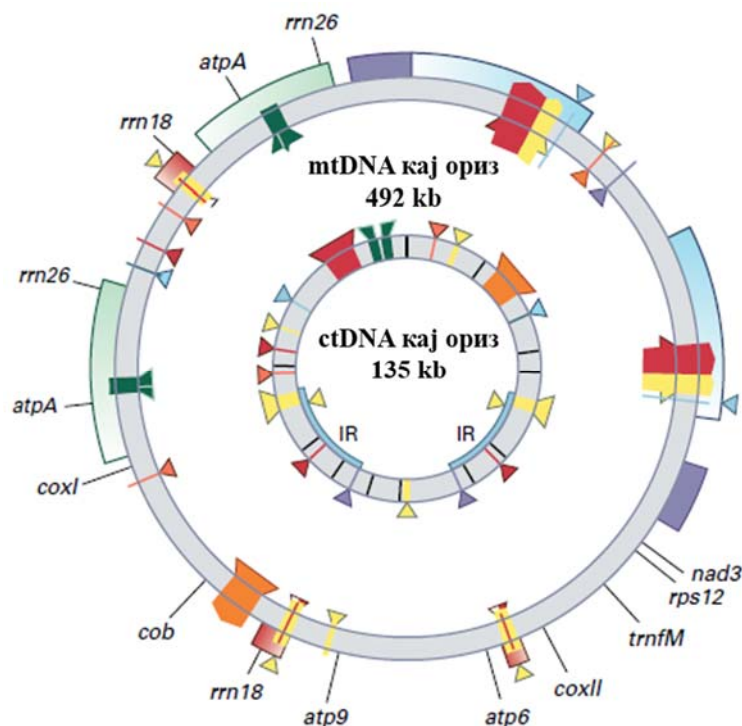
Митохондријалните DNA-молекули кај растенијата имаат варијабилна големина и организација, а сепак содржат иста генетска информација. Митохондријалните геноми не кодираат голем број на гени, бидејќи ензимите кои се неопходни за репликација, транскрипција и транслација се кодираат во јадрениот геном. Генските производи од митохондријалниот геном имаат примарна функција во оксидативната респирација, синтезата на АТФ или транслацијата на протеини во митохондриите на растителните клетки (Табела 1.3).

Табела 1.3 Функција на идентификувани гени во митохондријалниот геном на пченка.

Генски производ	Кратенка на гени	Функција
rRNA	<i>rrn18, rrn26, rrn5</i>	Синтеза на протеини
tRNA	<i>trn</i>	Синтеза на протеини
Рибозомски протеини	<i>rps, rpl</i>	Синтеза на протеини
NADH дехидрогеназа	<i>nad</i>	Транспорт на електрони
Цитохром c оксидаза	<i>cox</i>	Транспорт на електрони
Апоцитохром	<i>cob</i>	Транспорт на електрони
F ₀ F ₁ -АТРаза протеини	<i>atp</i>	Синтеза на АТФ

1.5.7 Идентификацијата на хомологни DNA секвенци кај повеќе од еден геном укажуваат на обемни движења на DNA меѓу геномите на растенијата

Проектите за секвенционирање на DNA откриле дека митохондријалните геноми на растенијата содржат хомологни нуклеотидни секвенци со хлоропластната DNA (Сл. 1.29). Исто така, во јадрените геноми се идентификувани митохондријални и хлоропластни DNA-секвенци. Овие откритија укажуваат на потенцијалниот трансфер на DNA-секвенци помеѓу клеточните органели и јадрото. Терминот „промискуитетна DNA“ најчесто се користи за да се опише DNA-секвенца која е присутна во повеќе од еден од трите генетски системи (јадрен, митохондријален и пластиден геном) кај еукариотските клетки. Различни типови на „промискуитетни“ DNA сегменти биле потврдени кај квасци, фунги, животни и растенија.



Слика 1.29 Компарација на митохондријалните (mtDNA) и хлоропластните (ctDNA) DNA секвенци кај ориз (*Oryza sativa*). Обоените трајголници и правоаголници на хлоропластниот геном (внатрешен круг) претставуваат DNA-секвенци кои се пренесуваат во митохондриите и се инсертираат на различни места во митохондријалната DNA (надворешен круг). Митохондријалните DNA секвенци не се инсертираат во хлоропластниот геном, што покажува дека трансферот на DNA може да биде еднонасочен или хлоропластите поседуваат ефикасен механизам за да се заштитат од навлегување на DNA-молекули (Buchanan и сор., 2015).

„Промискуитетните“ DNA секвенци најверојатно претставуваат реликти од интензивен DNA-трансфер помеѓу првобитните форми на клеточните органели и јадрото. Овие трансфери на DNA се одвивале во текот на долг временски период и даваат евидентни докази за еволуцијата на растенијата. Така на пр., *tufA* генот кој кодира фактор за синтеза на протеини во пластидите (protein synthesis factor) означен како EF-Tu е пластидијален ген кај алгите, меѓутоа претставува јадрен ген кај растенијата. Трансферот на *tufA* од пластидот во јадрениот геном најверојатно се одвивал во раниот период од еволуцијата на алгите од класата Charophyceae. Друг пример е генот *rpl21* кој кодира пластиден рибозомски протеин L21. Овој ген е присутен во пластидниот геном од *Marchantia*, како и во јадрените геноми на скриеносемените растенија. Според тоа, генот *rpl21* најверојатно бил пренесен во текот на дивергенцијата на невакуларните растенија и скриеносемените растенија. Од друга страна пак, трансферот на генот *rpl22* за пластидниот рибозомски протеин L22 најверојатно претставува доцен трансфер во текот на еволуцијата на скриеносемените растенија. Всушност, *rpl22* е присутен во пластидната DNA на сите растенија, освен кај легуминозните растенија, каде што овој ген се кодира во јадрото.

1.6 Транскрипција на DNA

Гените од јадрото и клеточните органели имаат значаен придонес во функцијата на индивидуалните клетки и развитокот на мултицелуларен организам. Експресијата на овие гени се регулира со цел да се овозможи на клетките соодветно да одговорат на промените во нивната средина, како и да се изврши координација на нивните активности во рамки на ткивото кои го сочинуваат комплексниот организам. Во јадрото, организацијата на гените во хроматинот и хромозомите има значајно влијание врз нивната регулација. Всушност, транскрипцијата на DNA, односно синтезата на RNA од DNA-урнек претставува примарен чекор во регулација на генската експресија. Транскрипцијата на DNA во RNA се одвива под дејство на DNA-зависни RNA полимеразии.

1.6.1 Пет јадрени RNA полимеразии транскрибираат различни типови на RNA молекули

Еукариотските јадра содржат три класи на DNA-зависни RNA-полимеразии, означени како RNA полимеразии I, II и III (**Табела 1.4**). RNA-полимеразите се врзуваат за специфични места на хромозомот познати како **промотори** и ја иницираат транскрипцијата. Бактериските RNA полимеразии можат да ја иницираат транскрипцијата на промотори во отсуство на дополнителни протеини. Од друга страна пак, еукариотските RNA полимеразии стапуваат во интеракција со специфични протеини наречени транскрипциски фактори со цел да се иницира транскрипцијата (**Сл. 1.30**).

Јадрените RNA полимеразии се комплексни ензими кои се составени од две големи субединици (125-220 kDa) и неколку мали субединици. Пет од помалите субединици се заеднички за сите три типа на RNA полимеразии. Како резултат на овие структурни сличности, трите класи на јадрени RNA полимеразии имаат неколку заеднички функционални својства, како што е потребата за дополнителни протеини за прецизна иницијација на транскрипцијата на промоторни региони.

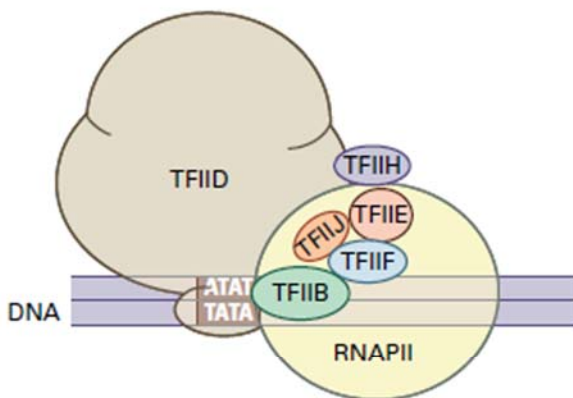
Табела 1.4 Јадрени DNA-зависни RNA полимерази кај растителни клетки.

Полимераза	Локализација	Производи
I	Нуклеолус	25S, 17S и 5,8S rRNA
II	Нуклеоплазма	mRNA, U1, U2, U4, U5
III Класа 1	Нуклеоплазма	5S rRNA
III Класа 2	Нуклеоплазма	tRNA
III Класа 3	Нуклеоплазма	U3, U6 и други мали стабилни RNA
IV	Нуклеоплазма	Транскрипти од транпозони и репетитивни елементи кои се процесираат во siRNA ¹
V	Нуклеоплазма	Кратки транскрипти од некодирачки региони

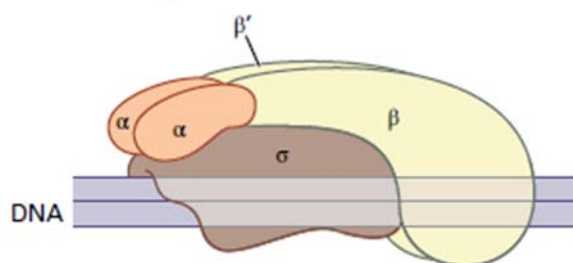
¹ siRNA: кратки интерферирачки RNA молекули.

Големата субединица на RNA полимераза II има С-терминален домен кој содржи бројни репетитивни консензус-секвенци Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Регулаторен протеински комплекс кој е наречен транскрипциски фактор II H (TFIIH) стапува во интеракција со RNA полимераза II и врши врзување на ензимот за промотор. Овој TFIIH протеински комплекс содржи протеин киназа и може да изврши фосфорилација на остатоците од Ser и Thr од С-терминалниот домен на RNA полимераза II. Овој процес на фосфорилација ја ослободува RNA полимераза II од промотор-иницирачкиот комплекс и на таков начин се овозможува ензимот да започне синтеза на mRNA од урнек-веригата на DNA.

Еукариотска RNA полимераза



RNA полимераза од *E. coli*

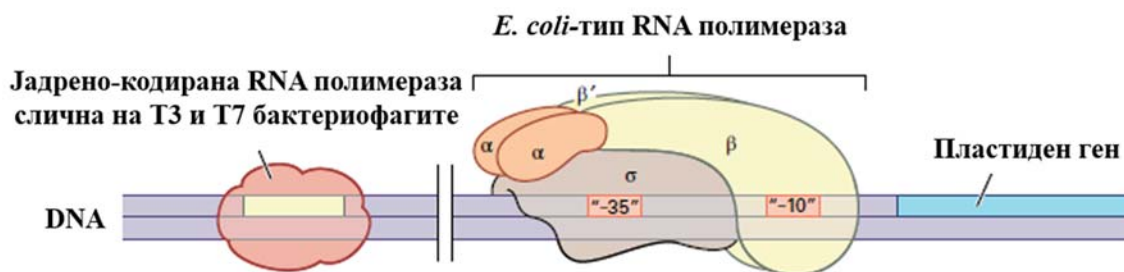


Слика 1.30 Компарацијата на еукариотските и прокариотските RNA полимерази покажува дека овие ензими се разликуваат според комплексноста во структурата. Еукариотската RNA полимераза II (RNAPII) претставува комплекс составен од повеќе субединици за кои се потребни неколку дополнителни протеини и регулаторни протеински комплекси за препознавање на промоторот кај TATA-елементот. Од друга страна пак, прокариотските RNA полимерази се состојат од четири централни субединици (α , α' , β и β') и регулаторни σ субединици. Високата комплексност во структурата кај еукариотската RNA полимераза II овозможува регулирање на транскрипцијата во јадрото преку бројни сигнали. TFII: транскрипциски фактори за RNA полимераза II (Buchanan и сор., 2015).

Растителните RNA-полимерази I, II и III се слични со другите еукариотски организми. Иницијацијата на транскрипцијата кај растенијата се контролира преку регулаторни механизми кои се слични со оние квасците и цицачите. Кај растенијата постојат две други RNA полимеразии (IV и V) кои продуцираат RNA молекули за епигенетска регулација на генската експресија (Табела 1.4).

1.6.2 Пластидите содржат различни DNA-зависни RNA полимеразии

Основната RNA-полимераза во пластидите е слична со *E. coli*, бидејќи содржи 5 централни субединици: α ($\times 2$), ω , β и β' , како и една од неколкуте регулаторни σ субединици. Хлоропластната DNA содржи гени за кодирање на протеини слични на субединиците α , β и β' кај *E. coli*, кои формираат ензимски комплекс во пластидите (Сл. 1.31). Исто така, во јадрените геноми на растенијата се идентификувани неколку гени за субединиците σ . Според овој модел, производите на пластидните и јадрените гени се комбинираат и формираат пластидијална RNA-полимераза која е слична на *E. coli* и учествува во транскрипцијата на пластидните гени.



Слика 1.31 Хлоропластите кај растенијата имаат два типа на RNA полимеразии. Присуството на пластидни гени за кодирање на протеини кои се слични на субединиците α , β и β' од RNA полимеразата кај *Escherichia coli* е потврда за постоењето на прокариотски-тип на хлоропластна RNA полимераза (десно). Во јадрените геноми на голем број растенија се идентификувани гени за кодирање σ -слични субединици, што покажува дека пластидијалните и јадрените геноми координирано ја регулираат транскрипцијата во хлоропластите. Всушност, кодираната RNA полимеразата во пластидите препознава хлоропластен промотор кој содржи типични „-10“ и „-35“ прокариотски консензус секвенци. Исто така, хлоропластните гени можат да се транскрибираат од страна на јадрено-кодирана RNA полимеразата со една субединица која е слична со RNA полимеразите на бактериофагот T3 и T7 (лево). Во присуство на специфични инхибитори за транслација на протеини кои ја блокираат синтезата на протеини во хлоропластот, транскрипцијата на хлоропластни гени може да продолжи како резултат на активноста на јадрено-кодираната RNA полимеразата (Buchanan и сор., 2015).

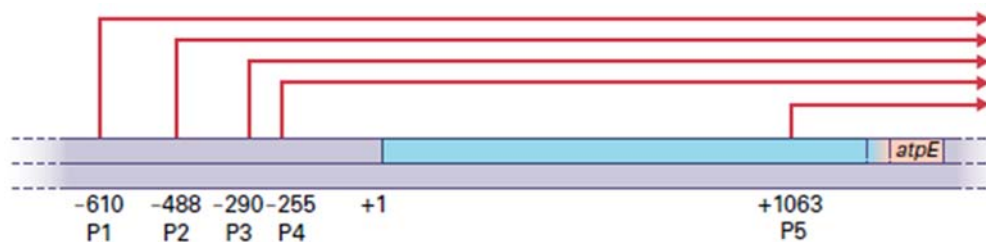
На проксималниот крај од места за иницијација на транскрипција, повеќето хлоропластни гени содржат DNA региони кои се слични со „-10“ и „-35“ консензус промоторни секвенци кај *E. coli*. Всушност, RNA полимеразата го препознава овој хлоропластен промотор за време на иницирање на транскрипцијата.

Во присуство на инхибитори на протеинска синтеза во пластидите, како и кај мутанти кои се дефектни во синтеза на протеини во хлоропластите настанува редукција во транскрипциската активност во хлоропластите. Сепак, оваа транскрипциска активност во хлоропластите не се прекинува поради губењето на функцијата на RNA полимеразата од типот на *E. coli*. Според тоа, пластидите најверојатно вршат импортирање на јадрена RNA

полимераза, која функционира заедно со RNA полимераза од типот на *E. coli*. Јадрената RNA полимераза наликува на RNA полимеразите кај бактериофагите T3 и T7 кои се составени од единичен пептид. Оваа нова RNA полимераза ги препознава промоторните региони кои се разликуваат во DNA секвенцата од конзервираните „-10“ и „-35“ консензус промоторни региони. Јадрено-кодираниите RNA полимеразите се активни во сите типови на пластиди (етиопласти, хромопласти и амилопласти). Важно е да се напомене дека конститутивната генска транскрипција во пластидниот геном има големо значење за одржување на хлоропластите и нефотосинтетските пластиди.

1.6.3 Гените од пластидите и митохондриите можат да имаат повеќе промотори

Познато е дека јадрените гени се карактеризираат со еден промотор кој се препознава од страна на RNA полимераза. Од друга страна пак, транскрипцијата на голем број пластидни гени и оперони се иницира од повеќе промотори или од повеќе места. Карактеристичен пример за транскрипција на пластидни гени од повеќе промотори е дицистронската *atpB-atpE* транскрипциска единица (Сл. 1.32).



Слика 1.32 Мултипли промотори ја насочуваат транскрипцијата на *atpB-atpE* генскиот кластер во хлоропластите на тутун (*Nicotiana tabacum*). Гените *atpB* и *atpE* ги кодираат субединиците β и ϵ на АТР синтаза и нивните кодирачки региони се меѓусебно преклопуваат со неколку нуклеотиди. Постојат пет иницијални места на транскрипција (од P1 до P5) покажани со црвени стрелки. Четири иницијални места на транскрипција содржат “-10” и “-35” мотиви на консензус секвенци, меѓутоа, секвенцата околу местото -290 (P3) не поседува такви мотиви (Buchanan и сор., 2015).

Транскрипцијата на голем број пластидни гени, особено гените за кодирање на протеини кои се вклучени во фотосинтезата се регулира во зависност од стадиумот на развојот на растенијата или факторите од животната средина (промени во условите на осветлување). Целокупната ефикасност на транскрипцијата во пластидите може да се контролира преку регулирање на бројот на активни промотори или преку промени во јачината на промоторите. Исто така, некои митохондријални гени имаат голем број промотори кои можат да ја контролираат нивната диференцијална експресија. Сепак, не е доволно познато дали различните типови на пластидни RNA полимеразите или кофактори на овие ензими се вклучени во селекцијата на промоторите или контрола на иницијацијата на транскрипција на повеќе места.

1.7 Карактеристики и функции на RNA

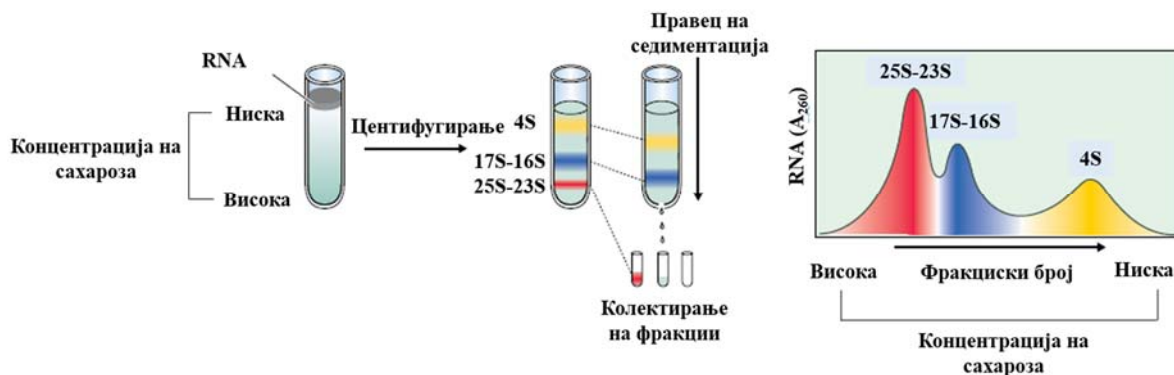
Молекулите на RNA се примарни производи на генската експресија кои имаат есенцијална улога во синтезата на протеини и други функции во клетката. Кодирањето на информациските RNA молекули (mRNA) е неопходен процес за синтеза на протеин, додека

пак, некодирачките RNA молекули се вклучени во процесирање и деградација на mRNA. Рибозомалните RNA (rRNA) молекули формираат комплексни тридимензионални структури кои се асоцираат со полипептидите и формираат рибозоми како главни клеточни органели за синтеза на протеини. Рибозомите служат како платформа за читање на mRNA молекулите, кои ги носат инструкциите за одредување на аминокиселинските секвенци на протеините. Транспортните RNA (tRNA) молекули имаат улога на адаптери за транслација на кодоните од mRNA (тринуклеотидни секвенци) во соодветни аминокиселини.

Покрај улогата во синтеза на протеини, RNA молекулите имаат биохемиски својства кои им овозможуваат да функционираат како геноми или како катализатори. Една таква карактеристика е способноста на RNA за саморепликација има клучно значење за еволутивниот развој на голем број RNA вируси кои вршат инфекција на еукариотски клетки. Друга карактеристика е способноста на RNA да катализира раскинување и формирање на ковалентни врски помеѓу нуклеотидите (пр. RNA-сплајсинг). Исто така, некои RNA молекули можат да формираат специфични структури кои овозможуваат висок степен на реактивност на одредени хемиски групи од еден или повеќе нуклеотиди. Често пати, овие RNA молекули се нарекуваат **рибозими**, бидејќи можат да катализираат раскинување или повторно спојување на полинуклеотидните вериги. Некои RNA молекули, како што се малите јадрени RNA (snRNA) молекули и RNA компонентата од теломераза се идентификувани во еукариотските јадра и учествуваат во RNA процесирањето и DNA репликацијата.

1.7.1 Класификацијата на RNA молекулите може да се изврши според нивната големина и функција

Вкупната екстрахирана RNA од клетките се состои од комплексна мешавина на полинуклеотидни вериги кои се разликуваат според нивната должина. Молекулите на RNA се означуваат според седиментацискиот коефициент, кој се изразува во Svedberg-ови единици (S или 10^{-13} секунди). Со примена на зонска седиментација можат да се сепарираат три главни фракции на RNA (23S до 25S, 16S до 17S и 4S RNA), (Сл. 1.33).

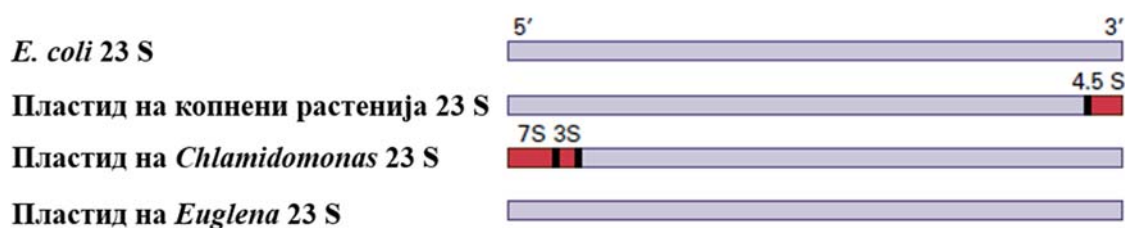


Слика 1.33 Сепарација на фракции на RNA со примена на зонско центрифугирање. Екстрактот со мешавина од RNA молекули се задржува на површината од раствор со концентрациски градиент на сахароза (од 2,5% до 15%) и се центрифугира. Под дејство на висока гравитациска сила, големите RNA молекули седиментираат побрзо во споредба со малите RNA молекули. По центрифугирањето, секвенциските фракции се колектираат од дното на центрифугалната епрувета и содржината на RNA во секоја фракција се одредува преку мерење на UV-апсорбанцата на бранова должина од 260 nm (Buchanan и сор., 2015).

Притоа, фракциите 23S до 25S и 16S до 17S содржат rRNA молекули, додека пак, фракцијата 4S вклучува tRNA молекули и мали некодирачки RNA молекули. Најголем дел од RNA во овие три фракции се релативно стабилни молекули, кои лесно можат да се детектираат со примена на гел електрофореза и боење со етидиум бромид. Од друга страна пак, mRNA молекулите се помалку застапени во клетката и опфаќаат од 1% до 2% од вкупната клеточна содржина на RNA. Молекулите на mRNA се карактеризираат со висок степен на варијабилност во големината и стабилноста и со примена на зонска седиментација или гел електрофореза не се сепарираат како посебна фракција.

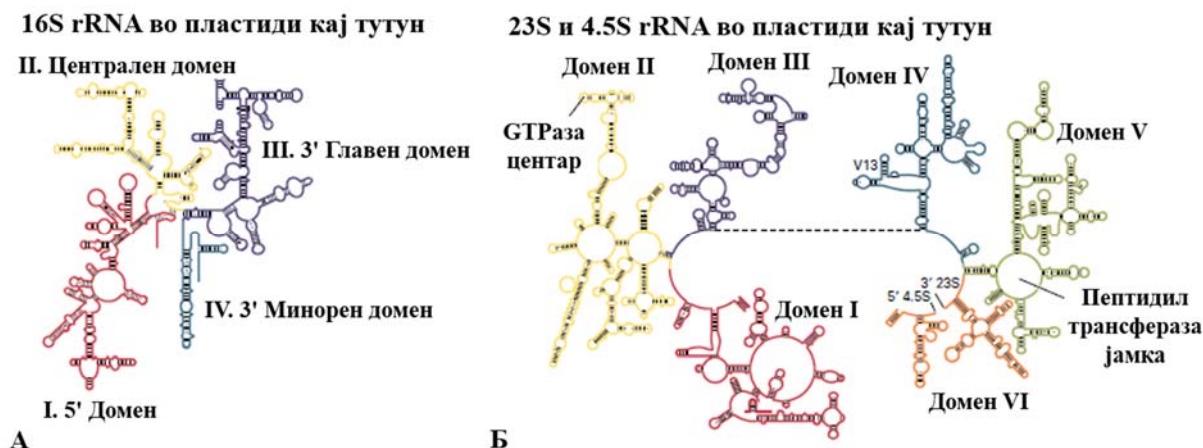
1.7.2 Најголем дел од клеточната RNA припаѓа на рибозомските RNA молекули

Познато е дека сите рибозоми се состојат од голема и мала субединица. Малата рибозомска субединица содржи само еден тип на rRNA молекул (rRNA на малата субединица), додека пак, големата субединица содржи еден долг rRNA молекул (rRNA на големата субединица), како и еден или повеќе кратки rRNA молекули. Растенијата, алгите и фотосинтетските протисти содржат три класи на рибозоми: цитоплазматски, пластидни и митохондриски рибозоми. Краткиот 5.8S rRNA молекул е карактеристичен за цитоплазматските рибозоми и се поврзува со 25S rRNA. Притоа, 5.8S rRNA е хомологна со секвенцата од 5' крајот на 23S rRNA кај *E. coli*. Пластидните 23S rRNA молекули имаат слична секвенца и должина со соодветните rRNA молекули кај *E. coli* и цијанобактериите (Сл. 1.34). Кај некои растенија и алги, 23S rRNA молекулите можат да се прекинат на пократки RNA-вериги. Митохондријалните рибозоми кај растенијата содржат краток 5S rRNA молекул, кој е отсутен кај анималните митохондрии. Карактеристична особина на прокариотските rRNA молекули е присуството на метилирани нуклеотиди, кои изнесуваат до 10 кај 16S rRNA и до 20 кај 23S rRNA.



Слика 1.34 Компарацијата на 23S rRNA кај *Escherichia coli* со пластидните 23S rRNA молекули од различни организми покажува разлики во организацијата. Имено, 23S rRNA кај *E. coli* има должина од 1904 нуклеотиди. Кај растенијата, пластидната 4.5S rRNA (црвена боја) е хомологна со 100 нуклеотиди на 3' крајот од 23S rRNA кај *E. coli*. Хлоропластниот геном кај *Chlamydomonas reinhardtii* содржи 7S и 3S rRNA молекули (црвена боја) кои се хомологни со 5' крајот од 23S rRNA кај *E. coli*. Од друга страна пак, пластид-кодираниот 23S rRNA молекул кај *Euglena* е континуиран, како и кај цијанобактериите и некои други алги (Buchanan и сор., 2015).

Малите и големите rRNA молекули се поврзуваат во комплексни секундарни структури (Сл. 1.35). Компарацијата на rRNA секвенците од голем број различни организми и клеточни органели покажува дека секундарните структури на rRNA молекулите се високо конзервирани и покрај тоа што постои значајна дивергенција во секвенците помеѓу организмите.



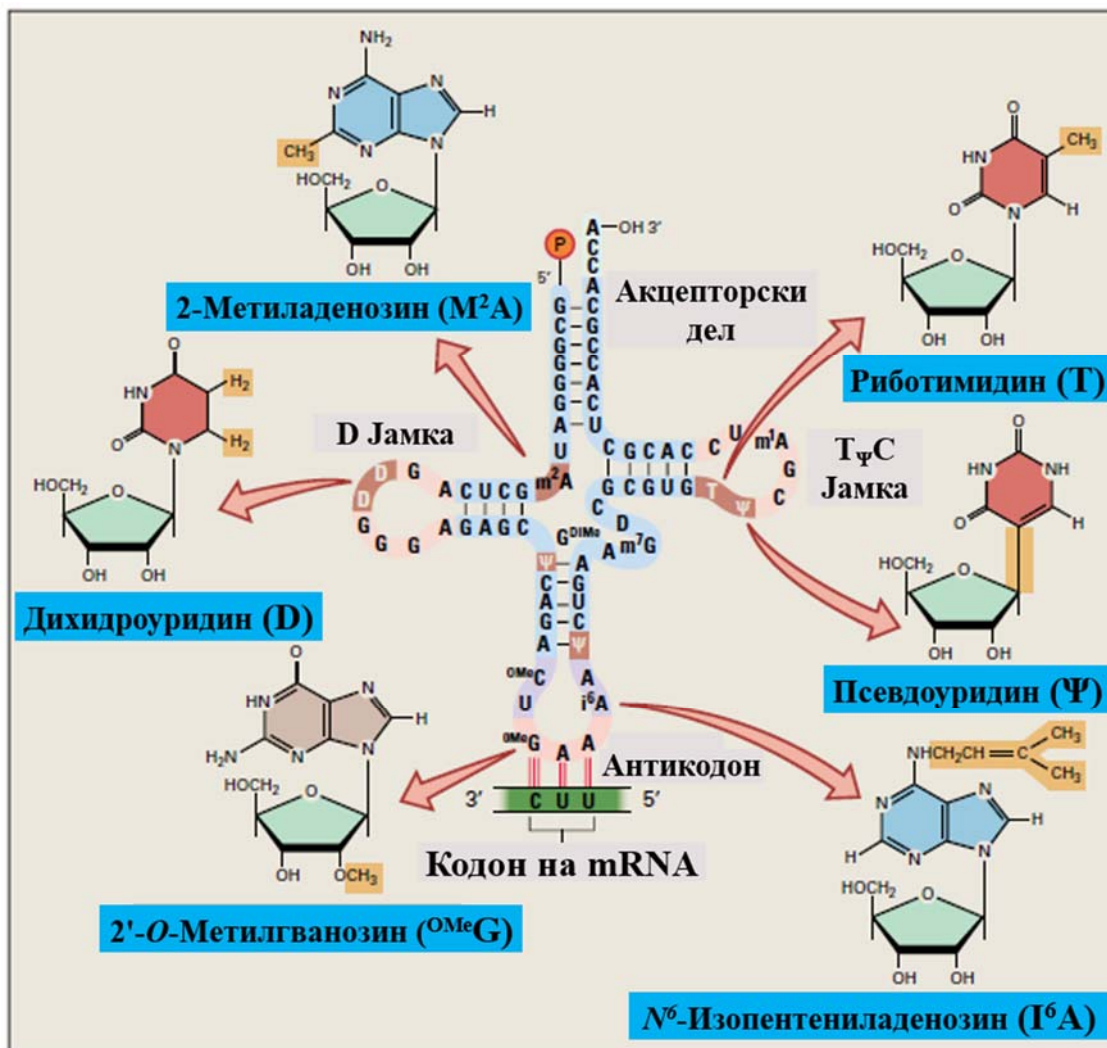
Слика 1.35 Рибозомалните RNA молекули можат да формираат комплексни секундарни структури преку спарување на комплементарните секвенци. (А) Секундарната структура на 16S rRNA во пластидите кај тутун е претставена со четири домени (од I до IV). Структурата на пластидната 16S rRNA кај тутун се базира на моделот за структурата на 16S rRNA кај *Escherichia coli*. (Б) Секундарната структура на пластидната 23S и 4.5S rRNA кај тутун покажува конзервирана организација со 6 домени (I-VI). Доменот V е главно место за врзување на tRNA за 50S субединицата (Buchanan и сор., 2015).

1.7.3 Растителните клетки содржат три различни типа на транспортни RNA молекули

Втората најзастапена RNA во клетките е tRNA, која доминира во составот на 4S RNA фракцијата од целиот клеточен екстракт на rRNA (Сл. 1.34). Молекулите на tRNA делуваат како адаптери и се врзуваат за специфични аминокиселини. Овие tRNA молекули со врзани аминокиселини базно се спаруваат со дефинирани mRNA кодони, при што се олеснува транслацијата на секвенцата на нуклеинската киселина во соодветен полипептид. Секој поединечен tRNA молекул може да прима само една од 20-те стандардни аминокиселини. Сепак, неколку различни tRNA форми, наречени изоакцептирачки (isoaccepting) tRNA молекули можат да врзуваат една иста аминокиселина. Сите секвенционирани tRNA молекули се прикажуваат според т.н. модел на лист од детелина (cloverleaf) (Сл. 1.36). Конзервираните примарни и секундарни структури на оваа класа на RNA молекули претставуваат огромен предизвик за пурификација на индивидуалните tRNA форми. Цитоплазмата, пластидите и митохондриите на растителните клетки содржат уникатен состав на tRNA молекули.

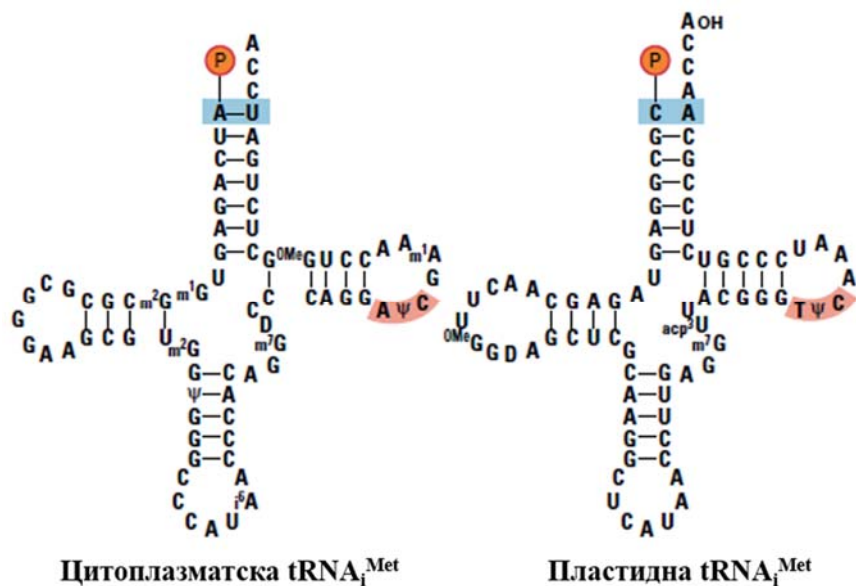
За разлика од митохондријалната DNA кај цицачите која ги кодира сите tRNA гени за транслација на протеини, митохондриите на растенијата и многу други организми не поседуваат целосен сет за tRNA гени. Овие податоци укажуваат на постоење на митохондријален импорт на tRNA молекули од цитоплазмата на растителната клетка, бидејќи во јадрената DNA се детектирани гени кои кодираат некои митохондријални tRNA молекули. Оваа хипотеза била потврдена кај трансгени растенија од компир (*Solanum* spp.) кои експресираат јадрен tRNA ген од грав (*Phaseolus vulgaris*). Всушност, tRNA од гравот била детектирана во цитоплазмата и митохондриите кај трансгени растенија од компир. Сепак, механизмот на митохондријален импорт на tRNA молекули од цитоплазмата не е доволно познат. Кај *Arabidopsis*, точкестата мутација кај генот за tRNA^{Ala} ја блокира аминокиселинацијата и импортоот на генскиот производ, што укажува дека аминокиселинацијата на tRNA синтазата има значајна улога при импортоот на tRNA молекулите во митохондриите на

растителните клетки. Од друга страна пак, пластидниот геном кај повеќето растенија кодира околу 30 типа на tRNA молекули, кои се доволни за транслација на протеините во оваа клеточна органела (**Табела 1.2**). Сепак, хлоропластната DNA кај нефотосинтетското паразитско растение *Epifagus* содржи само 17 tRNA гени (**Табела 1.2**). Според тоа, транслацијата во пластидите на *Epifagus* најверојатно вклучува tRNA молекули со потекло од јадрото, што покажува дека пластидите имаат способност за импорт на tRNA молекули.



Слика 1.36 Модел на лист од детелина на tRNA^{Phe} кај пченица, која претставува прва секвенционирана tRNA кај растенијата. На овој шематски модел се прикажани структурите на модифицираните нуклеотиди, кои се јавуваат на специфични позиции кај растителната tRNA. Сите четири краци на tRNA-моделот се именувани според нивната структура и функција. Акцепторскиот дел се состои од „стебло“ со нуклеотидни базни парови, кое продолжува до неспарена CCA секвенца на 3' крајот. Јамката TΨC е именувана според нејзиниот псевдоуридински остаток (Ψ). Варијабилниот антикодон кај различни tRNA молекули е составен од три нуклеотиди кои стапуваат во интеракција со mRNA за време на транслацијата. D-јамката е именувана според нејзиниот дихидроуридински остаток (D). Карактеристична особина на сите tRNA молекули е присуството на модифицирани (невообичаени) бази (Buchanan и сор., 2015).

Цитоплазматските tRNA молекули кај растенијата имаат слични нуклеотидни секвенци со tRNA формите во цитоплазмата на квасците и другите еукариотски организми. Сепак, голем број пластидни tRNA молекули имаат карактеристични особини за прокариотските организми (Сл. 1.37).



Слика 1.37 Иницијационата tRNA^{Met} во цитоплазмата кај грав (лево) е карактеристична за цитоплазматските tRNA молекули кај еукариотските организми. Од друга страна пак, иницијационата tRNA^{Met} во пластидите (десно) има слична структура со прокариотските tRNA молекули. Иницијационите tRNA молекули се разликуваат од елонгационата tRNA^{Met} поради одредени уникатни особини. Сите иницијационски tRNA молекули во цитоплазмата содржат AΨC секвенца наместо TΨC во TΨC јамката. Иако пластидната tRNA^{Met} има карактеристична TΨC-секвенца, нејзиниот 5' нуклеотид е невообичаен бидејќи не може базно да се спари со акцепторскиот дел (Buchanan и сор., 2015).

Имајќи го предвид различното потекло, некои митохондриски tRNA молекули кај растенијата имаат слични структурни особини со прокариотските tRNA молекули, додека пак, останатите молекули се слични со цитоплазматските форми на растителната клетка.

1.7.4 Цитоплазматските mRNA молекули се модифицираат по транскрипцијата

Информациските RNA молекули кодираат аминокиселински секвенци на протеините. Бројот на различни форми на mRNA молекули во една клетка изнесува повеќе од 10 000 и може да се спореди со бројот на различни протеини во клетката. Сепак, mRNA молекулите опфаќаат од 1% до 2% од вкупната содржина на клеточните RNA молекули. Во согласност со хетерогеноста во молекулските маси на полипептидите, должината на mRNA молекулите изнесува од неколку стотици до илјадници нуклеотиди. Молекулите на mRNA се понестабилни во споредба со rRNA и tRNA молекулите. Поединечните mRNA форми не можат директно да се визуелизираат преку боење со етидиум бромид, бидејќи се застапени во ниска содржина во клетките. Детекцијата на mRNA молекулите се одвива преку хибридизација со обележани проби на комплементарна DNA.

Карактеристичните mRNA молекули во цитоплазмата се состојат од пет различни региони (Сл. 1.38):

- структура на „капа“ на 5' крајот;
- 5'-непреводлив регион;
- протеин-кодирачки регион;
- 3'-непреводлив регион;
- полиаденилатна „опашка“ на 3' крајот.

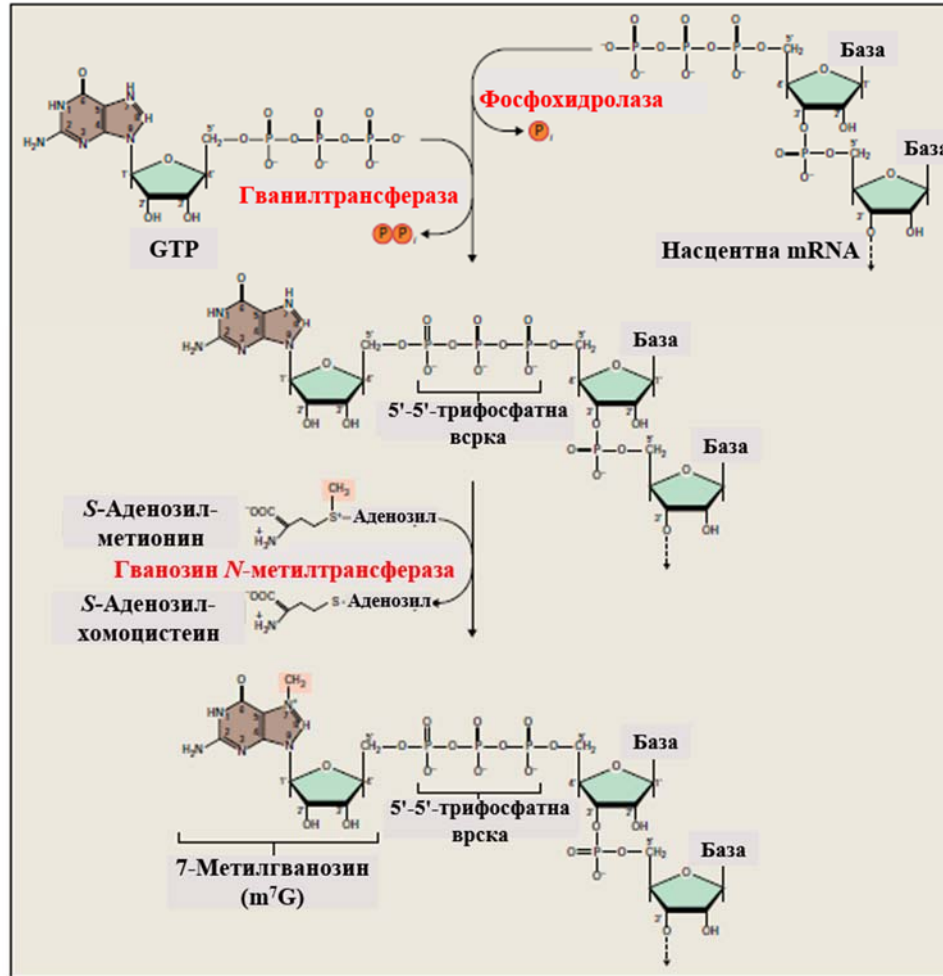


Слика 1.38 Структура на зрел, јадрено-кодиран mRNA молекул кај еукариотски организми. Повеќето зрели mRNA молекули имаат 5' и 3' непреводливи региони (untranslated regions-UTR). Овие UTR содржат cis-регулаторни секвенци за регулација на транслацијата или стабилноста на mRNA молекулите. Специфичните регулаторни секвенци на 3'-UTR се препознаваат од страна на поли(A) полимеразата, која синтетизира адиција на полиаденилатна „опашка“ на 3' крајот (Buchanan и сор., 2015).

Крајот 5' од mRNA најпрвин се модифицира или „капира“ преку додавање на нуклеотидот 7-метилгванозин (m^7G). За време на овој процес, mRNA го напушта комплексот на RNA полимеразата во јадрото, а остатокот од гванозин се поврзува со трифосфатна врска за нуклеотидот од 5' крајот. Потоа, атомот N-7 од гваниот се метилира (Сл. 1.39). „Капата“ на 5' крајот има важна улога при иницирање на транслацијата и овозможува заштита на mRNA молекулите од деградација за време на нивната синтеза.

Кодирачкиот регион претставува нуклеотидна секвенца што се преведува во аминокиселинска секвенца. Кодирачките секвенци започнуваат со иницијациони кодон (AUG) и завршуваат со терминациони кодон (UAG, UAA или UGA). Секвенцата помеѓу старт и стоп кодоните се нарекува отворена рамка на читање (ORF). Оваа рамка на читање е ограничена со 5' и 3' непреводливи региони (untranslated regions-UTR), кои имаат варијабилна должина. Според тоа, должината на mRNA не е секогаш во корелација со должината на кодираната аминокиселинска секвенца. Функцијата на 5' и 3' непреводливите региони кај mRNA молекулите не е доволно позната. Сепак, овие региони содржат RNA секвенци кои можат да формираат секундарна структура и да стапуваат во интеракција со протеините кои го регулираат транспортот, транслацијата и стабилноста на mRNA.

Повеќето цитоплазматски mRNA молекули содржат 3'-секвенца од полиаденилатна киселина. Оваа поли(A) „опашка“ не се кодира од DNA, туку пост-транскрипциски се додава на mRNA пред да се експортира од јадрото во цитоплазмата на клетката. Во овој процес учествува ензимски комплекс од ендонуклеаза и поли(A) полимеразата кој врши препознавање на сигнална секвенца (5'-AAUAAA-3') во близина на 3' крајот од транскриптот. Овој ензимски комплекс ја прекинува пред-mRNA (незрела mRNA) во близина на 3' крајот од сигналната секвенца и додава 20-250 остатоци од аденозин на 3' крајот. Формираната поли(A) „опашка“ го олеснува експортот на mRNA од јадрото, ја стабилизира mRNA од егзонуклеазна деградација и го иницира процесот на транслација.



Слика 1.39 Формирање на 5' „капа“ структура. Првиот нуклеотид во mRNA транскриптот најчесто е аденин или гванин, кој ја задржува неговата 5' трифосфатна група. Ензимот фосфохидролаза го прекинува фосфатот од 5' терминалниот остаток на mRNA. Натамошната реакција на 5' трифосфатот од GTP и 5' дифосфатот од mRNA се катализира под дејство на гванилтрансфераза, при што се добива 5'-трифосфат-5' нуклеотидна врска и се ослободува пиродифосфат. Потоа, ензимот гванозин N-метилтрансфераза врши пренос на метилна група од S-аденозилметионин на позиција 7 од остатокот на гванин (Buchanan и сор., 2015).

Структурата на пластидните и митохондриските mRNA молекули се разликува од цитоплазматските mRNA форми. Всушност, mRNA од клеточните органели не поседува 5' „капа“ и 3' поли(A) „опашка“ (Сл. 1.40). Како резултат на разликите во пост-транскрипциското RNA процесирање, митохондријалните mRNA молекули ја задржуваат 5' трифосфатната група, додека пак, 5' крајот кај повеќето пластидни mRNA молекули е монофосфорилиран. На сличен начин како и кај прокариотските mRNA молекули, 5' и 3' непреводливите региони на mRNA од клеточните органели можат да формираат т.н. „стебло-јамка“ структура која има регулаторна и стабилизирачка функција. Овие RNA структури стапуваат во интеракција со протеините и служат како сигнали кои влијаат врз процесирањето, транслацијата и деградацијата на mRNA. Една мала фракција на пластидна mRNA содржи краток поли(A) сегмент или регион богат со аденин на 3' крајот. За разлика од поли(A) опашката на цитоплазматската mRNA, 3' полиаденилатните секвенци на пластидните mRNA молекули стимулираат деградација на модифициран mRNA фрагмент.



Слика 1.40 Структура на зрел хлоропластен mRNA молекул. Хлоропластните mRNA молекули се слични со прокариотските mRNA форми и не се модифицирани на 5' крајот. Овие mRNA молекули завршуваат со 3'-јамка во форма на стебло, која претставува важна структура за процесирање и стабилноста на транскриптот (Buchanan и сор., 2015).

1.7.5 Еукариотските клетки содржат различни класи на мали RNA молекули

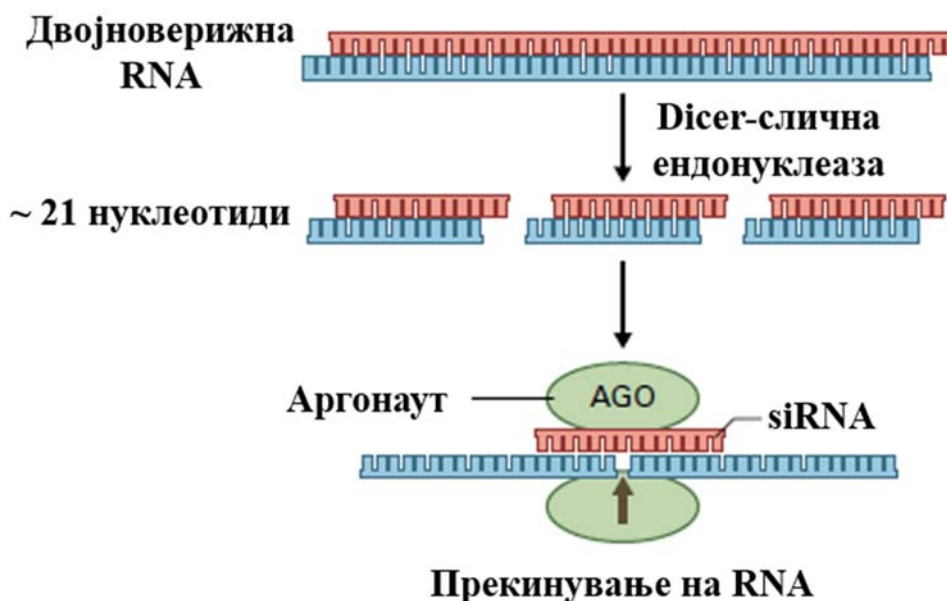
Голем дел од малите RNA молекули во растителната клетка имаат голем број на функции и можат да се поделат во две главни класи. Едната класа опфаќа мали нуклеарни RNA молекули (small nuclear RNA-snRNA) и мали нуклеоларни RNA молекули (small nucleolar RNA-snoRNA) со големина од 60 до 300 нуклеотиди. Втората класа е претставена со многу мали (20-24 нуклеотиди) RNA молекули, кои се добиваат од подолги примарни RNA молекули под дејство на Dicer-слични ендонуклеази. Малите нуклеарни и нуклеоларни RNA молекули (snRNA и snoRNA) се составни компоненти од малите рибонуклеопротеини (snRNP и snoRNP) кои имаат есенцијално значење при матурацијата на mRNA и rRNA молекулите, соодветно. Малите RNA молекули се нумерираат започнувајќи од U1 и оваа нумерација го означува хронолошкиот редослед на нивното откривање. Најголем дел од малите RNA молекули се детектирани во нуклеолусот и се означени како snoRNA (small nucleolar RNA). Неколку snRNA молекули содржат карактеристични 5' „капа“ структури, како и метилирани или модифицирани нуклеотиди. Повеќето snRNA молекули во snRNP се вклучени во сплајсингот, односно отстранувањето на некодирачките региони кои го формираат прекурсорниот mRNA молекул во јадрото. Останатите snRNA молекули (U7) учествуваат во процесирање на 3' крајот од хистонскиот пре-mRNA, кој не поседува поли(A) опашка. Најголем дел од snoRNA молекулите во јадренцето (каде се одвива транскрипцијата на рибозомалните RNA гени) се вклучени во процесирање на rRNA-прекурсорите. Кај растенијата не се идентификувани сите хомолози на фунгалните и анималните форми на snRNA и snoRNA молекули. Сепак, сличниот механизам RNA процесирање покажува дека овие кратки молекули на RNA се присутни кај растенијата.

1.7.6 Малите регулаторни RNA-молекули потекнуваат од генско стивнување посредувано со двојноверижни RNA молекули

Мали RNA молекули со големина од 20-25 нуклеотиди биле за прв шат откриени кај трансгени растенија со стивнати интродуцирани гени, како и кај растенијата инфицирани со вируси. Овие мали RNA молекули содржат секвенци од туѓа mRNA или вирусна

геномска RNA. Овие кратки RNA молекули интерферираат со експресијата на генот или преживувањето на вирусот и се нарекуваат мали интерферирачки RNA молекули (short interfering RNA-siRNA), а процесот во кој тие дејствуваат се нарекува RNA интерференција (RNAi).

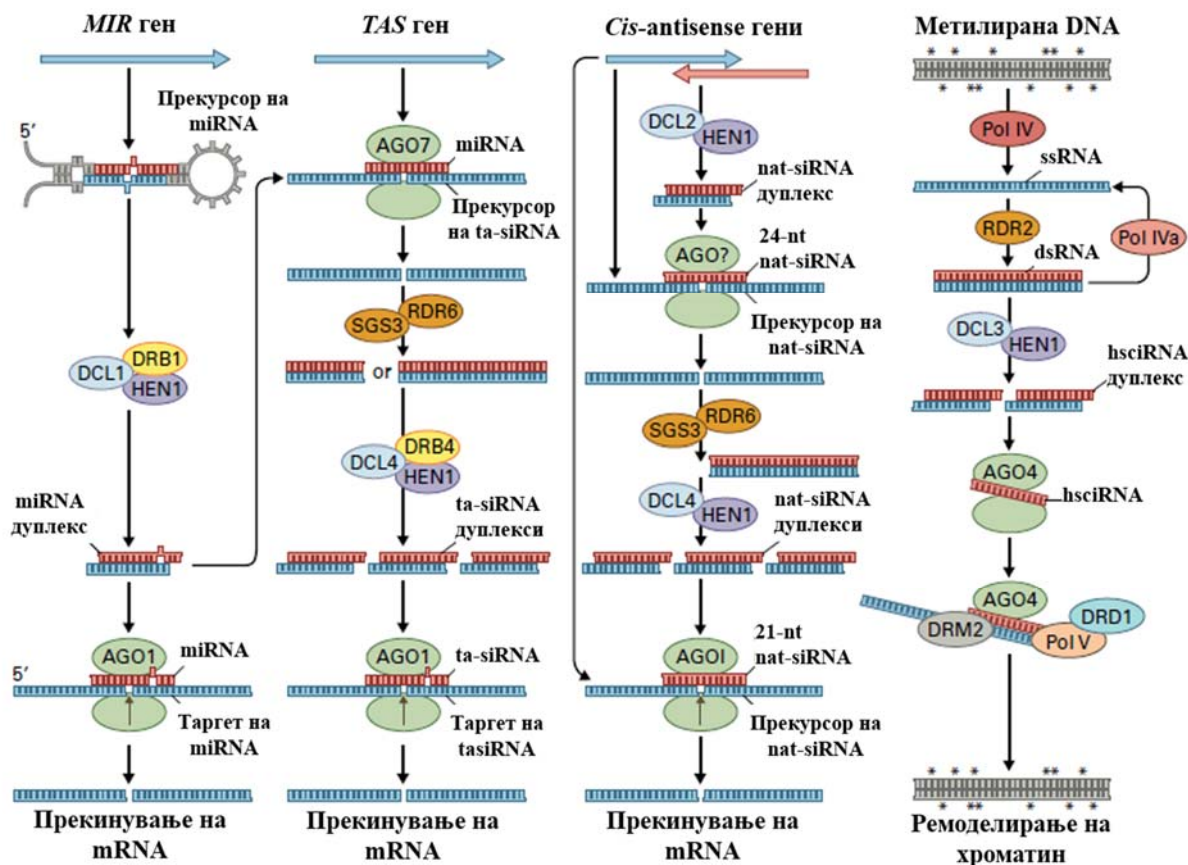
Овие siRNA молекули се добиваат под дејство на **Dicer-слични ендонуклеази (DCL) (Dicer-like endonucleases)** кои вршат прекин на долги двојноверижни (ds)RNA, кои се формирани од страна на RNA-зависни RNA полимерази (RNA-dependent RNA polymerases-RdRP) од клетката-домаќин или вирусни RdRP. Молекулите на siRNA имаат околу 21 нуклеотид и едната верига од DCL-формираниот RNA-дуплекс се поврзува со друга ендонуклеаза наречена **Аргонаут (AGO)**, која има улога во пронаоѓање на целни RNA молекули (Сл. 1.41). Всушност, siRNA-водечкиот AGO е главна компонента од **RNA-индуцирачкиот стивнувачки комплекс (RNA-induced silencing complex-RISC)**, кој врши прекин на целна RNA секвенца и ја намалува експресијата на интродуцираниот ген или експресијата на вирусот.



Слика 1.41 При основниот механизам на RNA интерференција, Dicer-слична ендонуклеаза врши препознавање и прекин на двојноверижен RNA молекул, при што се добиваат RNA-дуплекси со големина од 21 нуклеотиди. Една од веригите на RNA-дуплексот е означена како кратка интерферирачка (si) RNA секвенца и се поврзува со Аргонаут (AGO) ендонуклеаза. Притоа, siRNA го користи ензимот AGO за препознавање на едноверижна RNA (ssRNA) со комплементарна секвенца. Ензимот AGO врши прекин во средината на целниот регион од ssRNA (Buchanan и сор., 2015).

Механизмот на формирање и функционирање на siRNA-молекулите е поврзан со патиштата на продукција на четири други класи на RNA молекули со должина од 20-25 нуклеотиди (Сл. 1.42). Овие патишта овозможуваат формирање на микроRNA (microRNA-miRNA), транс-дејствувачки siRNA (trans-acting siRNA-tasiRNA), природни antisense siRNA (natural-antisense siRNA-natsiRNA) и хетерохроматични siRNA (heterochromatic siRNA-hcsiRNA). Сите четири типа на RNA молекули се метилирани на нивниот 3' нуклеотид со цел да се обезбеди заштита од полиуридилација и деградација. Молекулите на miRNA имаат должина

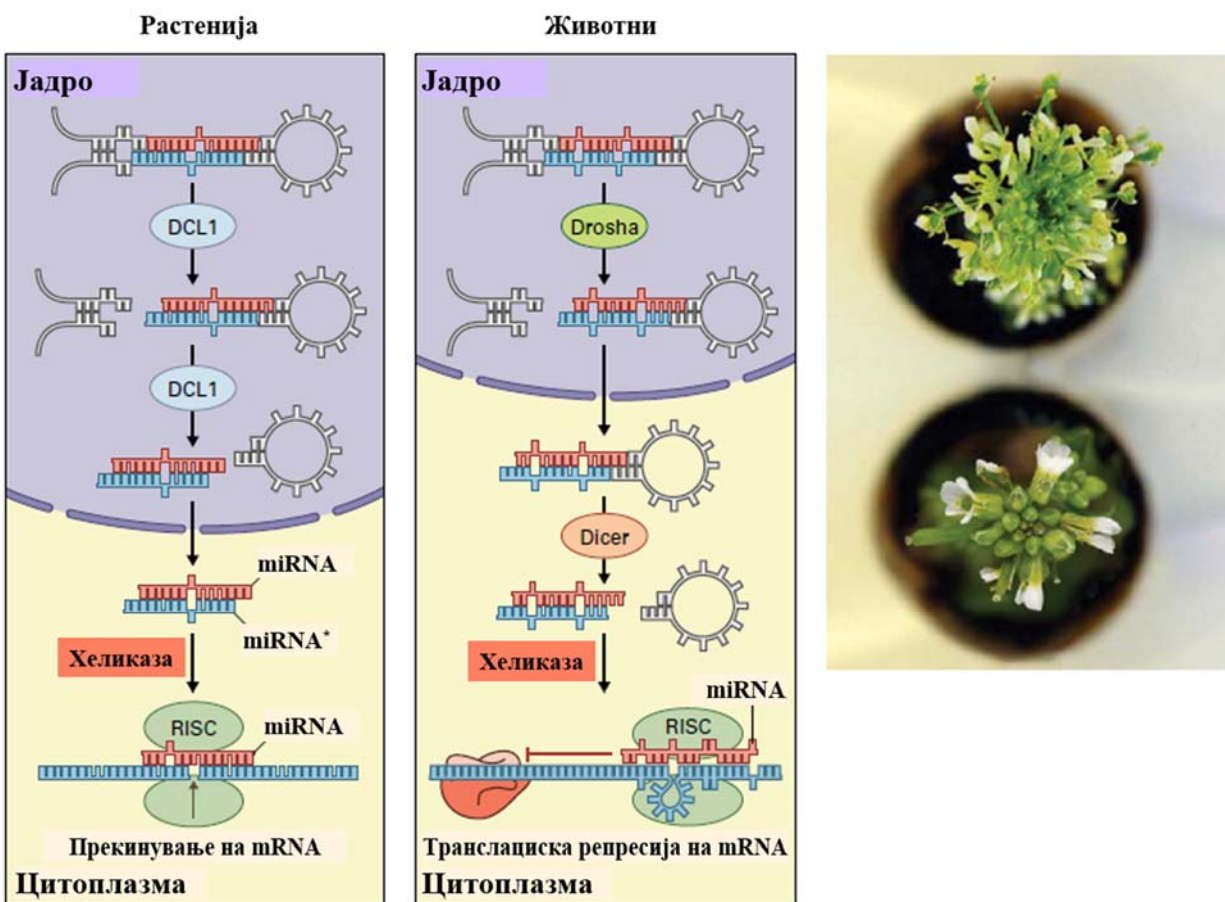
од 20 до 24 нуклеотиди, tasiRNA и natsiRNA имаат околу 21 нуклеотид, додека пак, hcsiRNAs имаат должина од 24 нуклеотиди. Разликите во големината на молекулите на siRNA се базира на хетерогеноста на DCL-ензимите кои учествуваат во нивното формирање.



Слика 1.42 Четири различни типа на Dicer-слични (DCL) ендонуклеази кај *Arabidopsis* учествуваат во формирање на мали RNA молекули, кои регулираат голем број различни патишта. Ензимот DCL1 формира микроRNA молекули (од RNA прекурсори во форма на шнола) кои ги регулираат гените поврзани со развитокот на растенијата. Ензимите DCL2 и DCL4 продуцираат siRNA-молекули (од dsRNA на реплицирачки RNA вируси) кои се вклучени во одбранбениот одговор кон вируси. Ензимот DCL3 формира hcsiRNA-молекули (од dsRNA на транспозони и други геномски секвенци) за таргетирање на хроматинска репресија. Овие патишта се меѓусебно поврзани и поседуваат некои заеднички компоненти, како што се RNA-зависни полимерази, двојноверижни RNA-врзувачки протеини и Аргонаут (AGO) ендонуклеази. Другите два патишта продуцираат tasi- или natsiRNA молекули, кои се вклучени во регулирање на развитокот на растенијата, како и одговорите кон стрес фактори (Buchanan и сор., 2015).

Сите еукариотски организми кодираат miRNA молекули. Кај *Arabidopsis* се идентификувани преку 350 miRNA молекули, додека пак, кај луѓето се потврдени околу 2000 miRNA молекули. Централната база на miRNA (<http://www.mirbase.org>) постојано се обновува со новооткриени miRNA молекули. Првиот регистриран miRNA од растенијата (*Arabidopsis*) во базата е под реден број 156 и се означува како AtmiR156. Оваа miRNA ја кодираат десет различни локуси од геномот на *Arabidopsis*, а добиената miRNA од секој различен locus се означува со алфабетски суфикс (од AtmiR156a до AtmiR156j).

Молекулите на miRNA имаат способност за регулирање на околу стотина гени преку намалување на нивната експресија во различни ткива или во различно време од развитокот на растенијата. Всушност, молекулите на miRNA ги контролираат промените во развитокот на растенијата, како и одговорите кон стрес факторите од животната средина и на таков начин обезбедуваат ткивно-специфична експресија на гените. За разлика од анималните miRNA-молекули кои делуваат преку репресија на транслацијата, растителните miRNA молекули функционираат преку прекинување на mRNA од целниот ген (Сл. 1.43).



Слика 1.43 Растенијата и животните произведуваат микроRNA (miRNA) молекули под дејство на DCL-сличните ензими кои вршат прекинување на прекурсори на RNA во форма на шнола. Овие miRNA се прикажани со црвена боја. Фазите на процесирање се одвиваат во различни клеточни компартмани кај растенијата и животните. Кај растенијата, молекулите на mRNA кај целните гени се прекинуваат од страна на miRNA-водечкиот Аргонаут (AGO), додека пак, AGO кај животните функционира преку репресија на транслација. На горната слика е прикажан мутант на *Arabidopsis* со значајно нарушување во развитокот и променет фенотип поради дефектен DCL1 протеин. На долната слика е прикажано растение од *Arabidopsis* со див-тип DCL1-ген и нормален развиток на цветови (Buchanan и сор., 2015).

На сличен начин како miRNA, молекулите на tasiRNA и natsiRNA ја намалуваат генската експресија преку AGO-посредувано прекинување на mRNA од целни гени. Кај *Arabidopsis*, молекулите на tasiRNA се формираат од само четири урнеци на RNA и нивната главна функција е регулирање на експресијата на фактори за одговор кон ауксини (auxin response factors). Од друга страна пак, постојат повеќе од 2000 natsiRNA-целни гени кај *Arabidopsis*.

Главната функција на natsiRNA-молекулите е обезбедување на дополнителен степен на генска регулација како одговор на условите на стрес од животната средина.

Најзастапени мали RNA-молекули кај растенијата кои се формираат под дејство на DCL ензимот се молекулите на hcsiRNA. Тие се формираат од транспозоните, репетитивните елементи и хетерохроматинските региони на растителниот геном. За разлика од mi-, si-, tasi- и natsi-RNA, молекулите на hcsiRNA со големина од 24 нуклеотиди не ја регулираат генската експресија преку катализирање на прекини на целни mRNA молекули. Всушност, hcsiRNA-молекулите функционираат преку инхибиција на транскрипцијата со регрутирање на модификатори на хистоните и DNA метилтрансферази до нивните целни региони во хромозомот. Притоа, ремоделирањето на хроматинот под дејство на молекулите на hcsiRNA го заштитува геномот од штетните ефекти на мобилните транспозони. Овој процес има значајна улога при краткотрајните епигенетски промени, кои настануваат како одговор на стрес факторите од животната средина, како и при одредување на развитокот на растителните клетки.

Покрај сите овие наведени мали RNA молекули, во растителните клетки се идентификувани и други типови на мали и стабилни RNA молекули (**Табела 6.4**). Така на пр., RNаза Р е неопходен ензим за процесирање на tRNA молекули и содржи интегрална RNA компонента. Исто така, молекулот 7SL RNA функционира во координација со одредени протеини за време на транспортот на протеините во ендоплазматичниот ретикулум.

Табела 1.5 Мали RNA молекули кај растенијата.

Тип	Ознаки	Локализација	Функција
Мали нуклеоларни RNA (snRNA)	U1, U2, U4, U9, U11, U12	Нуклеоплазма	Сплајсинг на незрела mRNA
	U7	Нуклеоплазма	Процесирање на незрела mRNA за хистони, адиција на поли(A) „опашка“
Мали нуклеоларни RNA (snoRNA)	U3, U8, U13, U40	Нуклеолус	Процесирање на незрела rRNA
Кратки интерферирачки RNA (siRNA)	siRNA	Цитоплазма	Одбранбен одговор кон вируси
МикроRNA (miRNA)	од miR156 до miR5666	Цитоплазма	Регулација на развиток и одговори кон стрес фактори
Trans-дејствувачки siRNA (tasiRNA)	од siR255 до siR1778	Цитоплазма	Регулација на фактори на одговор кон ауксини
Природни-antisense siRNA (natsiRNA)	natsiRNA	Цитоплазма	Авторегулација на гени
Хетерохроматични siRNA (hcsiRNA)	hcsiRNA	Јадро	Епигенетска регулација
Други мали RNA	RNаза Р	Нуклеоплазма, пластиди, митохондри	Процесирање на незрела tRNA
	7SL	Цитоплазма	Транспорт на протеини

1.8 Процесирање на RNA

Транскрипцијата е комплексен и високо регулиран процес при експресија на гените кој е неопходен за добивање на функционални RNA-молекули. Повеќето примарни RNA-транскрипти кај еукариотските клетки се процесираат за да се добијат зрели RNA молекули. Кодирачките региони кај многу еукариотски гени се раздвоени со секвенци кои не се присутни во зрелите RNA молекули. Примарните RNA-транскрипти кои се синтетизирани од страна на RNA полимерази се составени од кодирачки генски секвенци (егзони) и некодирачки секвенци (интрони), кои се отстрануваат со цел да добие функционален RNA-молекул. При транскрипција на гени кои содржат интрони во незрелите mRNA-молекули, секвенците на интроните се отстрануваат за да се формира зрел mRNA-молекул кој може директно да кодира протеин. Процесот при кој интроните се отстрануваат од незрелиот mRNA-молекул и егзоните меѓусебно се поврзуваат, при што се формира зрела RNA секвенца се нарекува **RNA сплајсинг (преспојување)**.

1.8.1 Интроните се присутни во RNA-молекулите од сите три геноми на растителната клетка

Интроните се присутни кај повеќето гени кои се наоѓаат во јадрените, хлоропластните и митохондријалните геноми. Сепак, бројот на интроните и фреквенцијата на гени кои содржат интрони се разликува меѓу растителните видови и клеточните органели. Така на пр., 155 интрони опфаќаат околу 40% од пластидниот геном кај *Euglena*, додека пак, хлоропластната DNA кај црвената алга *Porphyra* воопшто не поседува интрони. Повеќето протеин-кодирачки гени во јадрото на растителната клетка содржат еден или повеќе интрони, а некои гени, како што е генот за биосинтеза на зеин кај пченка (*Zea mays*) воопшто не поседува интрони. Според тоа, некои претставници од одредена генска фамилија имаат голем број интрони, додека пак, други претставници на гени не содржат интрони. Интроните не се присутни кај гените за 5.8S и 5S rRNA, како и кај гените за snRNA кај растителните клетки.

Повеќето интрони можат да се класифицираат во четири категории врз основа на структурните особини и механизмите на нивно сплајсирање (Табела 1.6).

Табела 1.6 Четири главни типа на интрони.

Тип	Структурни особини		Локализација
	Должина (нуклеотиди)	Места на сплајсинг	
Јадрени пред-mRNA	>70	G↓GU...AG↓N ¹	Јадрени mRNA
Јадрени пред-tRNA	11-13	Не се конзервирани	Јадрени tRNA
Група тип-I интрони	>200	U↓N...G↓N	Пластидни tRNA rRNA и mRNA
Група тип-II интрони	од <200 до >400	N↓GYGCG...AY↓N ²	

¹ Минорните класи на јадрени пред-mRNA интрони ги содржат следните секвенци на сплајсинг: N↓GC...AG↓U и N↓AU...AC↓N, каде N претставува било кој нуклеотид.

² Y претставува пиримидински нуклеотид.

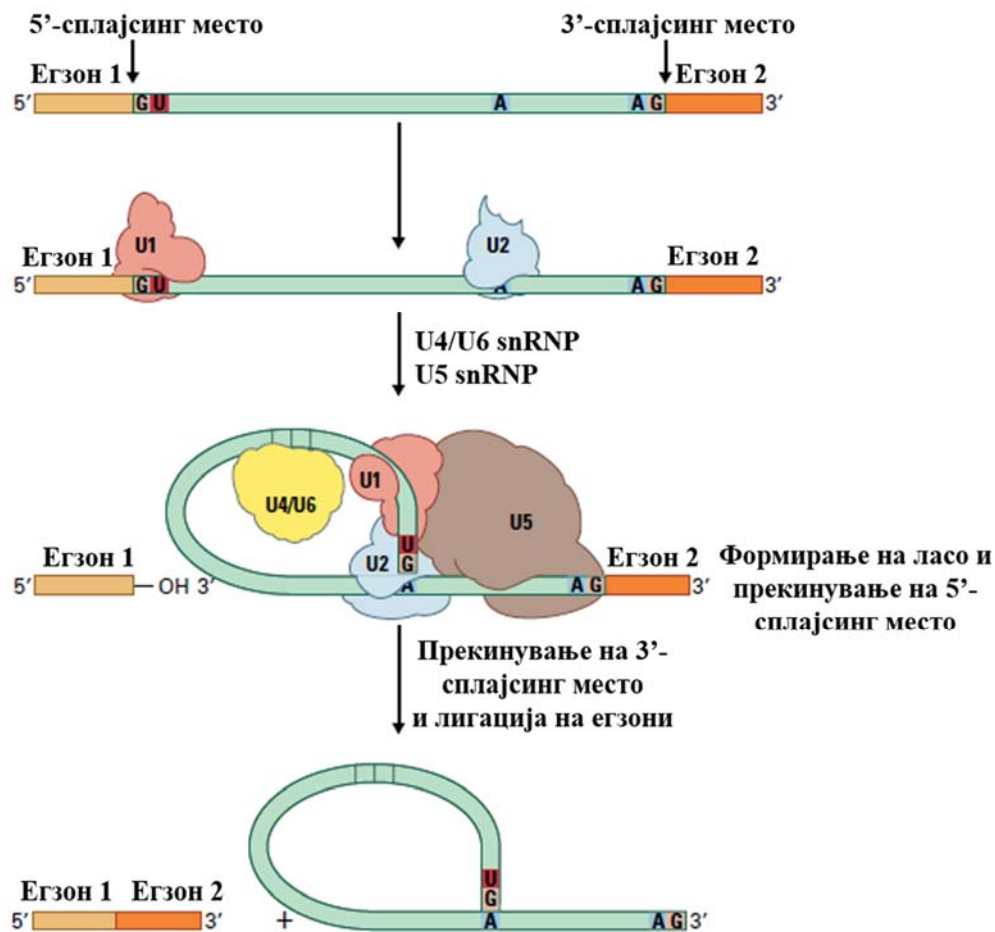
Интроните кај јадрените незрели mRNA (пред-mRNA) се најзастапен тип на интрони. Кај гените од мамалиски клетки, овие интрони значајно варираат во должина, односно нивната должина изнесува од 100 bp до 100 kb. Од друга страна пак, растителните гени поседуваат пократки интрони. Интроните кај јадрените незрели tRNA (пред-tRNA) молекули имаат кратка должина и се разликуваат од mRNA-интроните. Интроните од група I и група II се класифицирани според нивните примарни и секундарни структури и овие интрони се присутни во митохондријалните геноми на фунгите, како и во растителните митохондрии и пластиди. Петтата категорија на интрони (означена како група III интрони) се идентификувани кај видовите од родот *Euglena*. Денес се познати повеќе од 100 примери за овој тип на интрони.

1.8.2 Интроните од незрелите mRNA молекули кај растенијата се богати со AU и имаат конзервирани секвенци на нивните сплајсинг поврзувања

Интроните во растителните пред-mRNA молекули значајно варираат во должина (од 70 bp до преку 7 kb), меѓутоа, должината на овие интрони најчесто изнесува од 80 до 140 нуклеотиди. За ефикасен сплајсинг на интроните, неопходна е минимална должина на овие некодирачки секвенци, бидејќи интроните со помала должина од 70 нуклеотиди ретко се среќаваат кај протеин-кодирачките гени. За разлика од интроните во јадрените гени кај животните, јадрените пред-mRNA молекули кај растенијата се богати со аденозински и уридински рибонуклеотиди. Кај дикотиледоните растенија, овие интрони содржат во просек околу 70% базни парови од A-U. Составот на пред-mRNA интроните кај монокотиледоните растенија просечно изнесува 60% од A-U, а некои видови содржат помалку од 30% од овие базни парови.

Нуклеотидните секвенци кои се наоѓаат во близина на секое егзон-интрон спојување се високо конзервирани. Кај речиси сите интрони од јадрените mRNA молекули кај растенијата, граничните секвенци на 5'-сплајсинг местото (донорно место) и 3'-сплајсинг местото (акцепторно место) се состојат од 5'-GU и AG-3', што е познато како GU-AG правило. Во ретки случаи, граничните секвенците на интронските сплајсинг места се 5'-GC...AG-3' или 5'-AU...AC-3'. Исто така, постои дополнителен структурен елемент познат како место на разгранување, кое вообичаено е локализирано за 20-40 нуклеотиди спротиводно (во 5'-насока) од 3'-сплајсинг местото. За време на сплајсинг на интронот, 5'-крајот од интронот се врзува за аденински остаток од местото на разгранување, при што се формира интермедиерна структура во форма на ласо (Сл. 1.44). Кај интроните од квасци е идентификувана конзервирана секвенца UACUAAC, која се наоѓа на местото на разгранување. Кај растителните или мамалиските интрони оваа секвенца не е стриктно конзервирана.

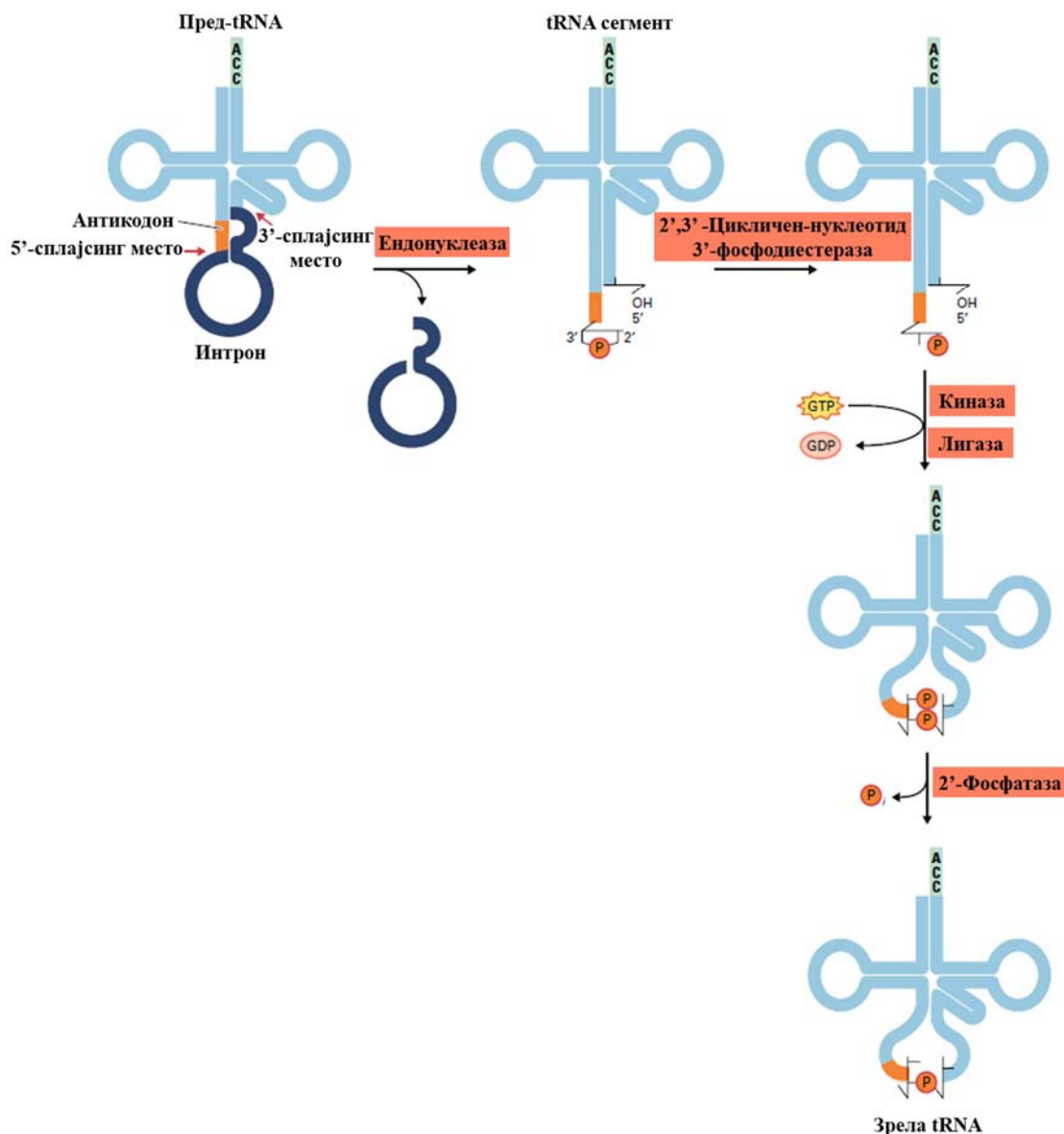
За разлика од животните, особено е тешко да се добие *in vitro* сплајсинг-систем од растителни ткива кој веродостојно ќе го прикаже процесот на *in vivo* пред-mRNA сплајсинг. Сепак, фундаменталниот механизам на пред-mRNA сплајсинг-системот кај растенијата најверојатно е сличен како и кај цицачите и квасците. Оваа хипотеза произлегува од фактот дека сите конзервирани елементи кои се присутни во интроните на растителните гени (5' и 3'-сплајсинг места и место на разгранување) се слични со елементите на интроните кај гените од цицачите и квасците.



Слика 1.44 Механизам на сплајсинг на интрони кај јадрен пред-mRNA молекул. Сплајсингот на интрони од пред-mRNA се одвива со посредство на рибонуклеопотеински комплекс познат како сплајсеозом, кој се поврзува со пред-mRNA. Сплајсеозомот содржи мали нуклеарни RNA молекули (snRNA) како U1, U2, U4/U6-комплекс и U5, кои се поврзани со мали рибонуклеарни протеини (snRNP). Реакцијата на сплајсинг се иницира со нуклеофилен напад на 2'-хидроксилната група на аденозинот од местото на разгранување врз 3'→5'-фосфодиестерската врска на 5'-сплајсинг местото. Потоа, 5'-гванозинот на границата егзон-интрон и аденозинот од местото на разгранување формираат 2'→5' фосфодиестерска врска. На таков начин се формира интермедиерна структура во форма на ласо и се ослободува 5'-егзонот. Сплајсингот се комплетира со втор нуклеофилен напад на 3'-хидроксилната група од 5'-егзонот врз фосфодиестерската врска на 3'-сплајсинг местото, при што настанува лигација на егзоните и отстранување на интронската структура во форма на ласо (Buchanan и сор., 2015).

6.8.3 Јадрените tRNA-интрони имаат конзервирана позиција на сплајсинг

Јадрените tRNA-гени кај еукариотските организми поседуваат кратки интрони (11-60 нуклеотиди). Притоа, 5'-сплајсинг местото е локализирано еден нуклеотид дистално од антикодонот. И покрај тоа што не постои конзервирана секвенца на сплајсинг поврзувањата, интроните содржат комплементарна секвенца на антикодонот од tRNA. Сплајсингот на јадрениот tRNA-молекул е најдобро проучен процес кај квасците. *In vitro* пред-tRNA сплајсинг-системот кај изртени семиња од пченица претставува модел за јадрен пред-tRNA сплајсинг кај растенија, кој што е сличен со клетките на квасците (Сл. 1.45).

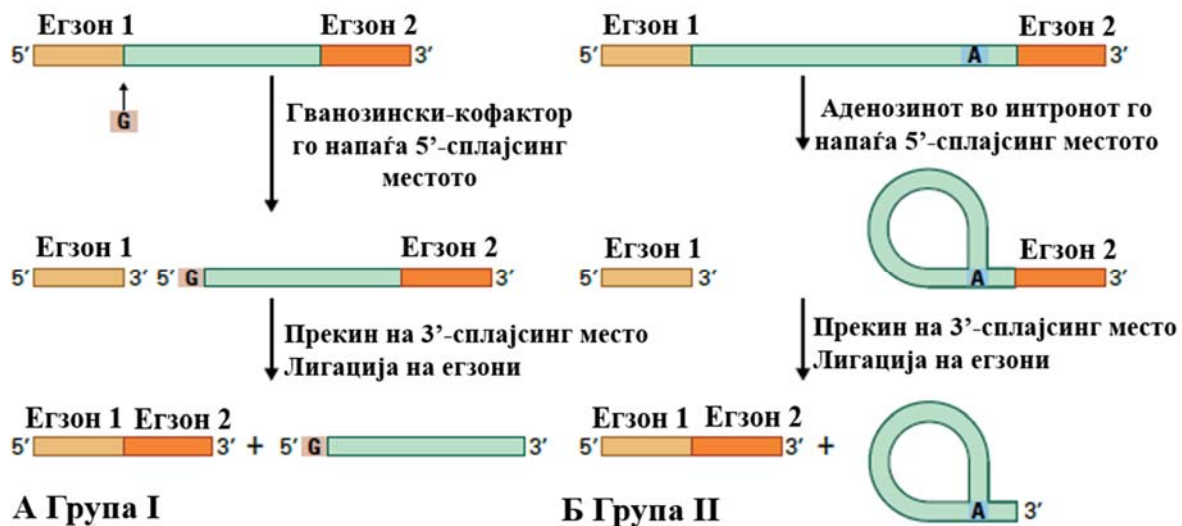


Слика 1.45 Механизам на сплајсинг на пред-tRNA. Ензимот ендонуклеаза катализира прекинување на пред-tRNA на двата краја од интронот (црвени стрелки). Оваа реакција овозможува формирање на циклична 2',3'-фосфатна група на 3' крајот од 5' tRNA-сегментот, како и слободна 5'-хидроксилна група на 5' крајот од 3' tRNA-сегментот. Цикличната фосфатна група се прекинува и се формира 2'-фосфатна група. Откако ќе се фосфорилира слободната 5' хидроксилна група на 3' tRNA-сегментот, двата сегмента на tRNA се поврзуваат под дејство на RNA-лигаза. Ензимот 2'-фосфатаза ја отстранува 2'-фосфатна група за да се добие зрел tRNA-молекул (Buchanan и сор., 2015).

1.8.4 Група I интроните можат да се самопреспојуваат (автосплајсинг) и да делуваат како мобилни генетски елементи

Група I интроните се дистрибуирани во митохондријалниот геном на квасците и други fungi, јадрените rRNA-гени кај некои едноклеточни еукариоти (*Tetrahymena*), како и во

гените од клеточните органели кај растенијата. Група I интроните се рибозими (RNA молекули со каталитичка активност), кои го прикажуваат значењето на RNA-катализираните реакции на сплајсингот во раниот период од еволуцијата. Секвенците на група I интроните имаат способност да формираат комплексни секундарни структури и ја започнуваат сплајсинг-реакцијата преку поврзување и активирање на нуклеотидот гванозин (G). Всушност, 3'-ОН групата од активираниот G нуклеотид го напаѓа 5'-сплајсинг местото и врши прекин на фосфодиестерската врска на тоа место, при што се ослободува егзон (Сл. 1.46A). Потоа, 3'-ОН групата од слободниот егзон го напаѓа 3'-сплајсинг местото, при што се ослободува интронот и се овозможува спојување на егзоните. Овие т.н. самопреспојувачки (автосплајсинг) група I интрони се задржале до денес, како што се јадрените rRNA гени кај *Tetrahymena*, како и некои хлоропластни и митохондријални гени кај растенијата.



Слика 1.46 Механизмите на самопреспојување (автосплајсинг) овозможуваат отстранување на група I и група II интроните. Сплајсингот на група I интроните се иницира кога молекул на гванозин или негов 5'-фосфорилиран дериват се врзува за интронска секвенца. Притоа, 3'-ОН групата на врзаниот гванозин ја напаѓа фосфатната група на 5'-сплајсинг местото и ја прекинува фосфодиестерската врска. Потоа, 3'-ОН групата од егзонот 1 реагира со фосфатот на 3'-сплајсинг местото, при што настанува лигација на двата егзона и се ослободува линеарен интрон кој понатаму се циркуларизира. Од друга страна пак, механизмот на автосплајсинг на група II интроните е сличен на сплајсингот на јадрени пред-mRNA молекули (Сл. 1.44), меѓутоа, овој механизам не се одвива со посредство на сплајсеозом (Buchanan и сор., 2015).

Некои претставници од група I интроните претставуваат мобилни генетски елементи, како што е интронот од пластидниот 23S rRNA-ген кај *Chlamydomonas reinhardtii*. При процесот познат како “intron homing”, овие мобилни интрони се пренесуваат со висока фреквенција на следната генерација преку генетско вкрстосување на родители кои имаат ваквов интрон и родители кои не го поседуваат интронот. Овие мобилни интрони кодираат DNA ендонуклеаза, која специфично го препознава алелот сиромашен со интрони и катализира двојноверижен прекин на DNA во близина на инсерцијата или “homing”-местото. Формираниот прекин на DNA ја иницира репликативната интеграција на интронот во алелот сиромашен со интрони.

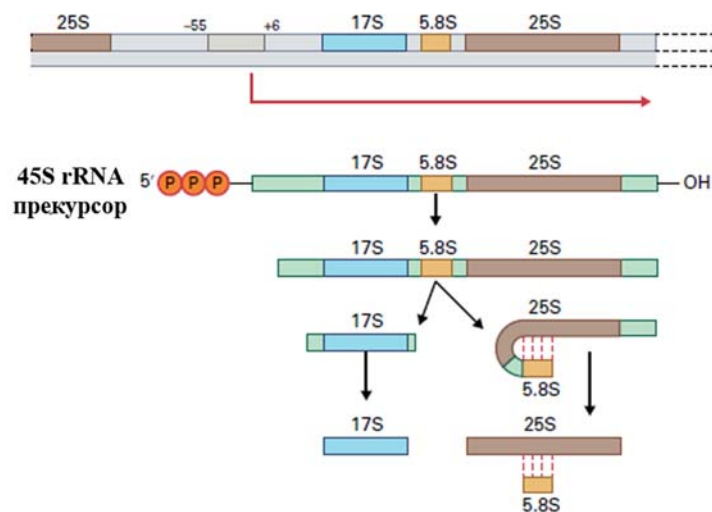
1.8.5 Група II интроните и јадрените пред-mRNA интрони имаат ист сплајсинг-механизам

Група II интроните се пронајдени во митохондријалните гени на фунгите, како и кај митохондријалните и пластидните гени кај растенијата. И покрај тоа што група II интроните значајно се разликуваат во структурата од пред-mRNA интроните, овие интронски секвенци имаат некои заеднички особини. Така на пр., група II интроните го следат GU-AG правилото, односно секвенците на нивните 5'- и 3'-сплајсинг места се идентични со соодветните секвенци кај јадрените пред-mRNA интрони и овие интрони содржат конзервирано место на разгранување со аденозин. Овие податоци покажуваат дека група II интроните и јадрените пред-mRNA интрони имаат заедничко еволуциско потекло и се карактеризираат со ист сплајсинг-механизам. Некои група II интрони од митохондриските гени кај квасците можат *in vitro* да се самопреспојуваат преку користење на високо реактивен остаток на аденин во интронската секвенца за да се формира структура на ласо (Сл. 1.4Б). Сепак, овој автокаталитички сплајсинг-механизам не бил потврден кај група II интроните од пластидни или митохондриски гени кај растенијата, што покажува дека кај овие интрони се неопходни дополнителни фактори за да се овозможи ефикасен сплајсинг.

1.8.6 Прекурсорните или незрелите RNA молекули подлежат на значајно процесирање за да се формираат функционални RNA молекули

Еукаритоски гени се транскрибираат како прекурсорни или незрели RNA (пред-RNA) молекули, кои потоа се процесираат во пократки RNA-форми (зрели RNA молекули). Процесирањето на прекурсорни RNA-молекули е строго контролиран процес и овие модификации имаат големо значење во продукцијата на функционални RNA-форми. Само одредени форми на мали и стабилни RNA-молекули кои се транскрибираат од страна на RNA полимеразата III не подлежат на значајно процесирање.

Транскрипциските единици на јадрениот rRNA-генски кластер кој кодира 17S, 5.8S и 25S rRNA се транскрибираат под дејство на RNA полимеразата I во единичен и долг прекурсорен молекул. Потоа, rRNA-прекурсорот подлежи на серија прекини и реакции на метилација за да се добијат зрели и функционални 17S, 5.8S и 25S rRNA-молекули (Сл. 1.47).

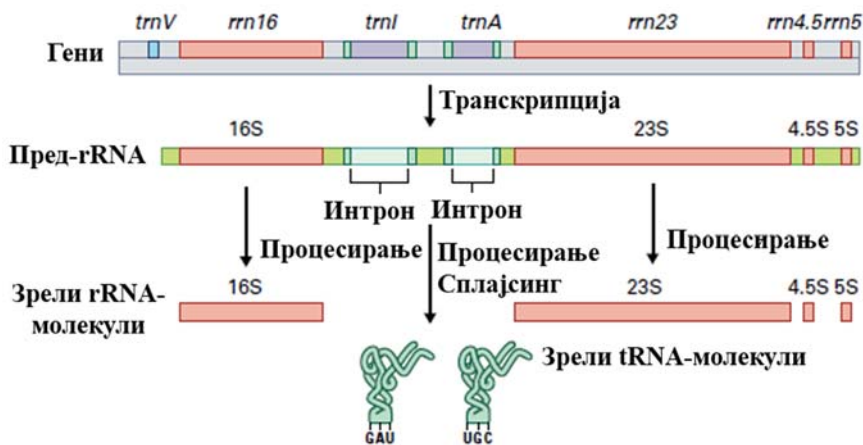


Слика 1.47 Процесирањето на јадрено-кодираниот 45S rRNA-прекурсор овозможува добивање на три зрели rRNA-молекули. Добиените 17S, 5.8S и 25S rRNA молекули потекнуваат од заеднички rRNA-прекурсор преку реакции на процесирање кои се одвиваат со поредство на неколку RNази. За време на процесирањето, 25S и 5.8S rRNA се поврзуваат со водородни врски и остануваат спарени додека да се комплетира процесирањето (Buchanan и сор., 2015).

Всушност, 5.8S rRNA потекнува од ист RNA-интермедиер како и 25S rRNA, односно базите на овие два производи на RNA остануваат спарени по отстранувањето на интергенските RNA-секвенци. Транскрипцијата на 5S rRNA од соодветните јадрени гени е независен процес кој се катализира под дејство на RNA полимеразата III. Овој цитоплазматски 5S rRNA-молекул е невообичаена форма, бидејќи не подлежи на процесирање.

Сите четири пластидни rRNA-молекули (16S, 23S, 4.5S и 5S rRNA) се кодираат како полицистронска транскрипциска единица која вклучува и два tRNA-гени. Овие tRNA-гени кодираат tRNA^{Ile} и tRNA^{Ala} и содржат по еден невообичаено долг интрон. При комплексниот механизам на процесирање во присуство на специфични ендонуклеази, прекурсорниот RNA-молекул се пресекува и се формираат 16S, 23S, 4.5S и 5S rRNA-молекулите (Сл. 1.48). Откако ќе се отстранат од полицистронската RNA, пресечените tRNA-прекурсори се процесираат и преку сплајсинг-механизмот се добиваат функционални молекули на tRNA^{Ile} и tRNA^{Ala}. Исто така, rRNA и tRNA кај растителните митохондрии подлежат на значајно процесирање од нивните прекурсорни молекули.

За разлика од 5S rRNA, tRNA-молекулите се кодираат од кластери на јадрени гени и со посредство на RNA полимеразата III се транскрибираат во прекурсорни молекули кои содржат дополнителни секвенци на 5'- и 3'-краевите. Овие дополнителни секвенци се отстрануваат под дејство специфични ендонуклеази, што е проследено со адиција на три нуклеотиди (CCA) на 3'-крајот. Некои tRNA-прекурсори содржат интрони кои се отстрануваат при процесирањето за да се добијат функционални tRNA молекули (Сл. 1.45).

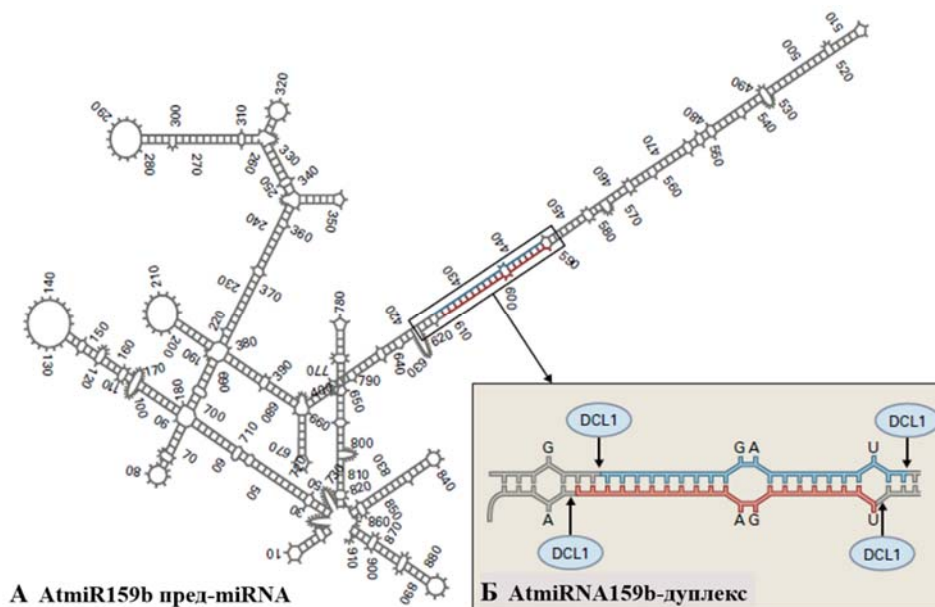


Слика 1.48 Процесирање на хлоропластен пред-rRNA молекул кај растенија. За разлика од rRNA-молекулите кои се кодираат во јадрото, хлоропластниот rRNA-оперон кодира две tRNA-молекули во интергенските региони, кои ги одвојуваат 16S и 23S rRNA. Овие tRNA-кодирачки секвенци се прекинати со долги интрони (околу 1 kb) и затоа е неопходно да се изврши процесирање и сплајсинг за да се добијат зрели tRNA-молекули (Buchanan и сор., 2015).

1.8.7 RNA-транскриптите се процесираат во мали регулаторни RNA-молекули

Малите RNA-молекули учествуваат во регулирање на ендегената генска експресија преку специфична деградација на mRNA и модификација на хроматинот. Овие молекули се процесираат од долги двојноверижни или самокомплементарни едноверижни RNA-молекули. Секој од четирите типа на регулаторни мали RNA-молекули се добиваат под

дејство на Dicer-слична ендонуклеаза (DCL), (Сл. 1.43). Кај растенијата постојат четири типа на DCL-ензими (DCL1-DCL4). Ензимот DCL1 врши отсекување на miRNA-дуплекс од едноверижен транскрипт во форма на шнола (Сл. 1.49А). Овој транскрипт се добива со посредство на DNA-зависна RNA полимераза II од *MIRNA* гени кои се наоѓаат во интергенските региони на геномот.



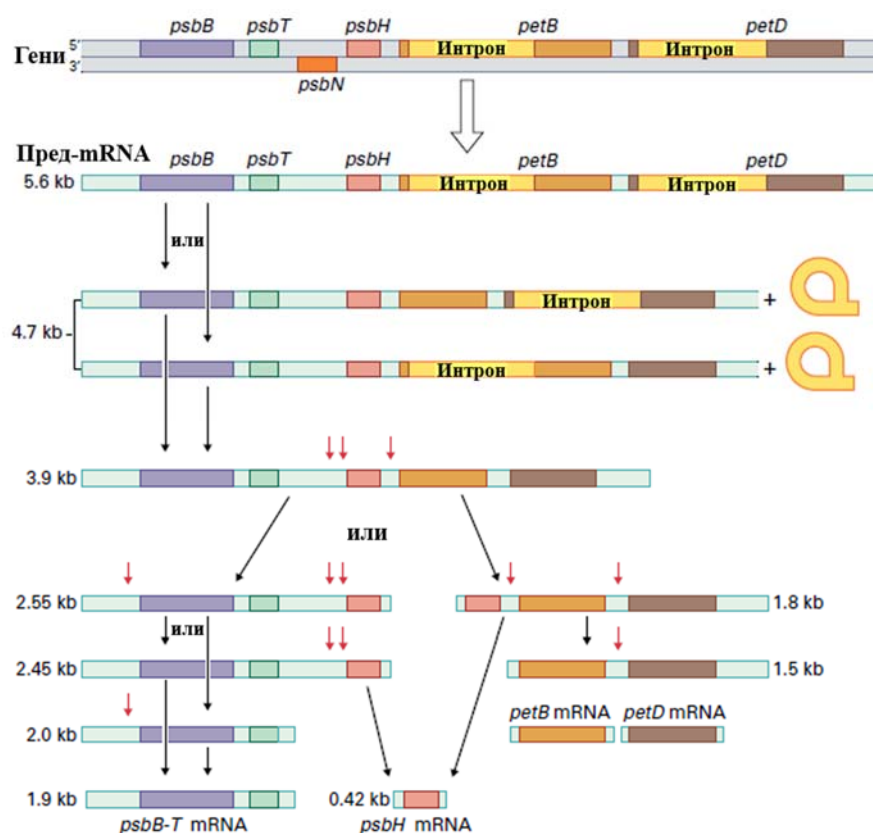
Слика 1.49 (А) Зрела микроRNA (црвени линии) прецизно се откинува од нејзиниот примарен транскрипт под дејство на Dicer-слична1 (DCL1) ендонуклеаза. (Б) МикроRNA се откинува како дуплекс со големина од 21 нуклеотиди кој е изграден од miRNA-верига (црвена линија) и нејзина сестринска miR*-верига (сина линија). Местата на прекинување на DCL1-ензимот се прикажани со стрелки. Откако ќе се пресече, RNA-дуплексот има преклопување од 19 нуклеотиди помеѓу веригите и 3'-протрузиите од два нуклеотида (Buchanan и сор., 2015).

Ензимот DCL1 специфично отсекува дуплекс од 21 нуклеотиди од RNA-транскриптот во форма на шнола, при што се добиваат нерамномерни пресекувања на секој крај како 3'-протрузии составени од 2 нуклеотида. Исто така, постојат други DCL-ензими кои вршат отсекување на *tasi*-, *natsi*- и *hcsi*RNA молекули од двојноверижни RNA-молекули кои се синтетизирани со посредство на **RNA-зависни RNA полимерази (RdRP)** од едноверижни урнеци. Ист тип на цитоплазматски RdRP-ензим формира двојноверижни RNA-молекули за да се добијат *tasi*- и *natsi*RNA молекули. Сепак, оваа полимераза се регрутира до *tasi*RNA-урнек под дејство на специфична miRNA, како и до *natsi*RNA-урнек со посредство на мал RNA-молекул кој е формиран од страна на ензимот DCL2. Двојноверижниот RNA-прекурсор за формирање на *hcsi*RNA се добива во јадрото под дејство на различни RdRP-ензими. Овие ензими делуваат врз транскрипт кој претходно е добиен од страна на DNA-зависна RNA полимераза IV. Без разлика на тоа кој тип на DCL-ензим или двојноверижен RNA-супстрат стапуваат во интеракција, ензимите DCL вршат прекинување на двојноверижниот RNA-дуплекс како супстрат и пренесуваат само една верига од овој дуплекс на Аргонаут (AGO) ендонуклеазата. При добивање на miRNA, водечката верига со AGO се нарекува miRNA, додека пак, отсечената верига означена како miR* се нарекува сестринска верига (Сл. 1.49Б). Така на пр., ензимот AGO1 главно учествува во отсекување

на целни mRNA-молекули кои се добиени од mi-, tasi- и natsi-RNA. Активирањето на модификатори на хистони и DNA-метилтрансферази од страна на hcsiRNA-молекули се одвива под дејство на AGO4-ензимот, кој поседува активност на врзување, а нема способност за прекинување на вериги. Според овој модел, интергенските репетитивни региони од геномот имаат кратки транскрипти кои се добиваат под дејство на DNA-зависни DNA полимерази V, кои остануваат поврзани со нивните DNA-урнеци и се достапни за препознавање од hcsiRNA-молекул кој е поврзан со AGO4. На таков начин се овозможува регрутирање на епигенетски модификатори до соодветна локација во геномот (Сл. 1.43).

1.8.8 Некои пластидни mRNA-молекули се полицистронски единици

Хлоропластниот геном кај повеќето растенија содржи околу 150 гени, а само 60 од нив се транскрипциски единици. Најголем дел од пластидните mRNA-молекули се синтетизираат како полицистронски mRNA-молекули под дејство на хлоропластната RNA-полимераза. За разлика од полицистронските mRNA-молекули кај бактериите кои подлежат на транслација без процесирање, полицистронските mRNA-молекули од хлоропластите се процесираат пред да се формираат моноцистронски mRNA-молекули (Сл. 1.50).



Слика 1.50 Транскриптот од *psbB*-оперонот во растителните пластиди е типичен пример за комплексно процесирање и сплајсинг-реакции на полицистронски mRNA-прекурсор. Процесирањето на овој полицистронски прекурсор овозможува добивање на зрели моноцистронски mRNA-молекули кои подлежат на ефикасна транслација. Црните стрелки ги прикажуваат алтернативните чекори на процесирање, а црвените стрелки ги прикажуваат местата на прекини кои се експериментално потврдени. Генот *psbN* се кодира од спротивната DNA-верига и не претставува дел од полицистронскиот транскрипт (Buchanan и соp., 2015).

Разликите во процесирање помеѓу бактериските и хлороплатните mRNA-молекули не се доволно познати. Сепак, анализите на мутанти кои не поседуваат хлоропластна функција покажале дека процесирањето е неопходен процес за транслација на пластидни mRNA-молекули. Овие податоци покажуваат дека процесот на транслација на mRNA во пластидите се разликува од процесот кај прокариотите.

1.8.9 Изменување на RNA-молекулите (RNA editing) се одвива кај транскриптите од клеточните органели кај растенијата

Изменувањето на RNA-молекулите (RNA editing) ја променува протеин-кодирачката секвенца кај некои mRNA-молекули. Овој тип на процесирање за прв пат бил откриен кај транскрипти од митохондријални гени на *Trypanosoma*, каде што секвенцата на RNA се разликува од соодветната DNA-секвенца. Исто така, изменувањето на RNA-секвенците било потврдено кај голем број различни генетски системи, како што се растителните митохондрии и хлоропласти.

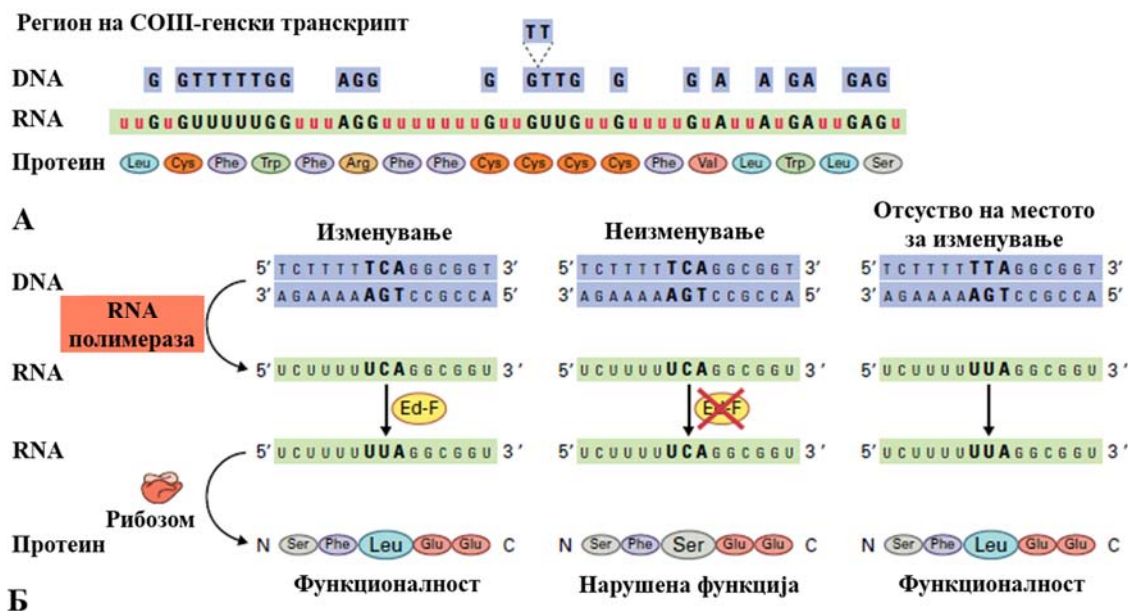
Промените на примарните транскрипти се одвиваат преку два типа на механизми на изменување на RNA: инсерција или делеција на нуклеотиди и конверзија (модификација или супституција) на нуклеотиди (Табела 1.6). Механизмот на изменување на нуклеотиди преку инсерција и делеција бил испитуван кај *Trypanosoma* (Сл. 1.51А) и *Physarum*, каде транскриптите се значајно изменети преку инсерција на долги повторувања на урацил (U). Притоа, кратки-RNA молекули (познати како водечки RNA-молекули) содржат информација која е неопходна за изменување. Водечките-RNA молекули се комплементарни на изменетите делови на зрелиот mRNA-молекул. Овие водечки RNA-молекули содржат кратки поли-U секвенци на нивниот 3'-крај, кои ги донираат U-нуклеотидите што се инсертираат за време на изменувањето.

Табела 1.6 Појава на изменување на RNA-молекули.

Тип на изменување	Организам	Органела	Транскрипт	Модификација
Инсерција/Делеција	<i>Trypanosoma</i>	Митохондрии	mRNA	Инсерција/Делеција на U
	<i>Physarum</i>	Митохондрии	mRNA	Инсерција на C
Конверзија	Растенија	Митохондрии	mRNA	C → U, U → C
			tRNA	C → U
			tRNA	C → U
		Пластиди	mRNA	C → U, U → C
	Цицачи	Јадро	mRNA	C → U
	Еуметазои	Митохондрии	tRNA	Различен тип

Механизмот на конверзии на нуклеотиди е застапен кај транскриптите од растителните митохондрии и хлоропласти, цицачите, вирусите и нижите еукариоти. Овој тип на изменување на RNA предизвикува мали промени во mRNA-секвенцата. Повеќекратните конверзии специфични за позиција од C во U (ретко од U во C) се јавуваат кај примарни транскрипти од пластидните и митохондријалните геноми (Сл. 1.51Б). Фреквенцијата на изменување на RNA е специфична во зависност од типот на клеточната органела или генот, а дистрибуцијата на изменетите места е по случаен избор. Конверзијата на C во U се јавува

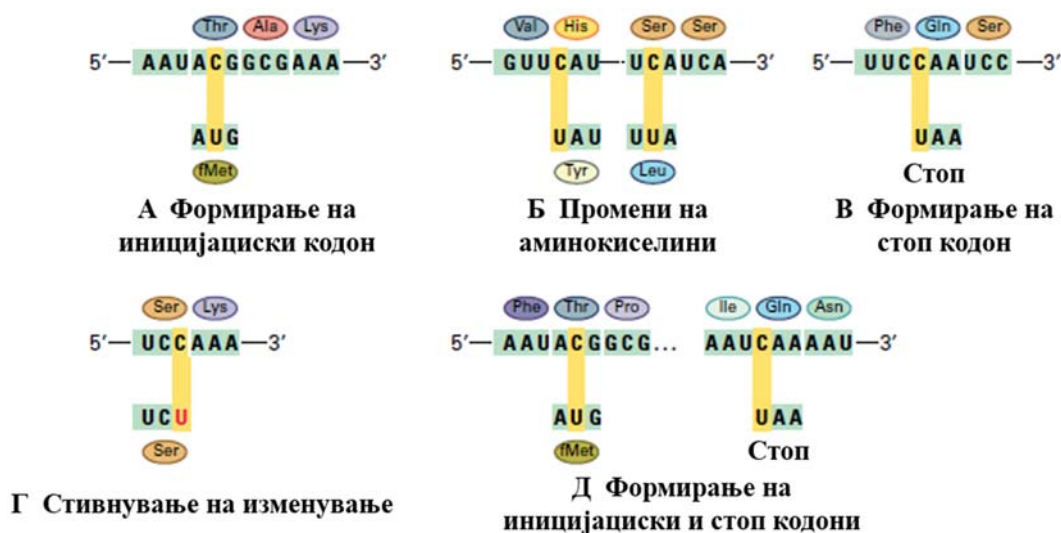
кај речиси сите протеин-кодирачки региони на митохондријалните транскрипти. Така на пр., вкупниот број на изменети места во митохондријалниот геном од пченица (*Triticum*) изнесува околу 1200, додека пак, овој број е околу 30 во хлоропластниот геном од скриеносемените растенија.



Слика 1.51 Механизми на изменување на RNA кај протеин-кодирачките региони на митохондријалните транскрипти кај *Trypanosoma brucei*. (А) Компарацијата на DNA-секвенца (виолетова боја) и RNA-секвенца (зелена боја) за цитохром оксидаза III кај митохондриите покажува значајни разлики. Притоа, RNA-секвенцата е значајно подолга во споредба со DNA-секвенцата поради изменувањето на RNA преку инсерција на долги низи од базата урацил (U). Кодираниот протеин од изменетиот зрел-mRNA молекул има слична аминокиселинска секвенца како и консензус секвенцата кај протеините за цитохром оксидаза III. Неопходната информација за изменување на RNA произлегува од водечките RNA-молекули (не се прикажани), кои се комплементарни на деловите од изменетата mRNA. (Б) Изменувањето на RNA од хлоропластите на терестричните растенија опфаќа промени на специфични цитидини во уридини на ниво на RNA-молекул. Често пати, изменувањето на RNA влијае врз UCA-серинските кодони преку нивно конвертирање во UUA-леуцински кодони (лев панел). Неизменувањето на местото на изменување (среден панел) предизвикува нарушувања и добивање на мутанти со нефункционален ген, поради тоа што неговиот транскрипт останал неизменет. Отсуството на местото на изменување, како на пр. базата T е присутна на ниво на DNA (десен панел) не предизвикува добивање на мутантен фенотип (Buchanan и сор., 2015).

Изменувањето на одредени mRNA-молекули од клеточните органели кај растенијата претставува есенцијален процес за транслација на точен протеин. Повеќето конверзии на нуклеотиди опфаќаат изменување на првиот или вториот нуклеотид од кодонот и на таков начин ја променуваат аминокиселинската секвенца на протеинот (Сл. 1.52). Промената на аминокиселината предизвикува транслација на високо конзервиран протеин, како што е предвидено преку компарацијата на DNA-секвенца на даден ген и неговиот изменет mRNA-транскрипт со DNA-секвенците на истиот ген кај организми кои не вршат изменување на mRNA. Во ретки случаи, изменувањето на RNA-молекулот може да се јави на третата позиција од кодонот. Сепак, овој тип на изменување е стивнат и не настанува модификација на предвидениот протеин поради повторливоста (редундантноста) на генетскиот код.

Исто така, изменувањето може да ги скрати предвидените отворени рамки на читање (ORF) од DNA-секвенците или да се продуцираат нови ORF. Така на пр., изменувањето на кодоните за глутамин (CAA и CAG) и кодонот за аргинин (CGA) предизвикува добивање на кодони за терминација (UAA, UAG и UGA) и на таков начин настанува предвремена терминација на ORF кај митохондриите и пластидите. Овие изменети стоп-кодони вршат конвертирање на предвидената С-терминална екстензија на протеинот во конзервирана големина на протеин. На сличен начин, кодонот за треонин (ACG) може да се конвертира во старт-кодон (AUG). Според тоа, изменувањето на С во U може да предизвика формирање на иницијациски и терминациски кодон во рамките на еден транскрипт и да се добие нова ORF. Овие примери покажуваат дека геномското секвенционирање на DNA не е доволно за да се предвидат генските производи во клеточните органели.



Слика 1.52 Неколку типови на изменувања на mRNA-молекулите кои вклучуваат супституција на бази можат значајно да ги нарушат полипептидните производи кои се кодирани од RNA-секвенците (Buchanan и сор., 2015). Супституциите на бази можат да формираат иницијациски кодон на транслација (А), предизвикуваат промени на аминокиселините (Б) или формираат стоп кодон (В), што предизвикува предвремена термимирање на транслацијата. Некои супституции на бази во кодирачките региони не ја нарушуваат аминокиселинската секвенца и настанува стивнување на изменувањето (Г), додека пак, други типови на супституции интродуцираат иницијациски и стоп кодони, при што се добива нова отворена рамка на читање (Д).

Процесот на изменување на RNA во растителните митохондрии и хлоропласти се карактеризира со одредени заеднички особини, како што се: конверзијата на С во U, високиот афинитет за втората позиција на кодонот, како и одредени промени на кодонот. Исто така, во транскриптите на митохондриите и хлоропластите се идентификувани заеднички секвенциски мотиви околу местата на изменување. Овие сличности покажуваат дека системите на изменување на RNA во хлоропластите и митохондриите имаат заеднички компоненти и механизми. Важно е да се напомене дека изменувањето на RNA во хлоропластите не зависи од транслација на протеини кои се вклучени во овој процес. Овие податоци покажуваат дека сите протеински компоненти кои се неопходни за изменување на RNA се кодираат во јадрениот геном, а потоа се импортираат во хлоропластите.