Интрондар

- Интрондар жануар мен өсімдік геномында көп сипатталған, сонымен қатар олардың вирустарын инфекциялаушылардың геномында жақсы көрсетілген.

- Интрондарды тапқаннан кейін олар тек эукариот генінде ғана болады деп ойлаған. Бірақ кешірек интрон Т4 бактериофагының тимидилат синтетазасының прокариоттық генінен табылған және Ser тРНК генінен, Archaebacteria рРНҚ генінен табылған.

- Интрондар мРНҚ, рРНҚ және тРНҚ жеке түрлерін кодтайтын ядролық генде болады; осы органеллалардың мРНҚ, рРНҚ және тРНҚ-сын кодтайтын хлоропласт пен митохондрия гендерінде болады.

- Гистондарды, α- және β-интерферонды, 5,8S- және 5S-рРНК кодтайтын гендерде интрондар болмайды, сонымен қатар U-РНК, 7SL-РНК және 7SK-РНК дағы ешбір генде болмайды.

- Барлық интрондар РНҚ-ізашарлардың құрамында транскрипцияланады және соның салдарынан сплайсинг деп аталатын қосылыстың үзілуі процесінде жойылады.

Ядролық мРНҚ гендерінің интрондары

- Экзондардың өлшемі негізінен 52, 140, 223 және 299 н.ж көлемінде болады.

- Ядролық мРНҚ –ның барлық интрондарының ерекше белгсі болып 5’-ұшында арнайы тізбектің болуы табылады –көбінесе CRG (R-пурин) тізбегін қорғайды және 3’-ұшының G –дің бір қалдығын қорғайды.
- РНҚ-дағы интронның 5’-ұшында бастапқы екі нуклеотид болып әрқашанда GU (GC екі жадайда ғана кездеседі) тұрады, келесі 4 нуклеотид кішкене варьияцияланыу мүмкін, бірақ канондық болып (A/G)AGU тізбегі табылады.

- G және U қалдығының жүйелену орнында орнын ауыстыруы негізінен сплайсингті бұғаттайды, ал көршілес негіздердің ауысуы сплайсингке әртүрлі әсер етеді.

- Интронның 3’-ұшында әрқашан AG жұбы тұрады, оның алдында сүтқоректілердің интрондарында пиримидинге бай бөлік (Y_nNYAG) орналасады .

- Константты А және G-ның басқа негіздерге алмасуына әкелетін мутациялар, сонымен бірге осы сайтта сплайсингті де бұғаттайды.

Таблица 8.4. Канонические последовательности вблизи сайтов сплайсинга разного типа [1)]

Тип интрона	5′-сайт сплайсинга	Вблизи 3′-сайта сплайсинга	3′-сайт сплайсинга
Ядерная про-мРНК (суммарная)	CRG↓GU$^{A}_{G}$AGU	A	Y_nAG↓N
Ядерная про-мРНК (дрожжи)	↓GUAUGU	UACUAAC	Y_nAG↓N
тРНК	N↓N		N↓N
Группа I (ядерная рРНК, митохондриальная мРНК и рРНК)	U↓		G↓
Группа II (митохондриальная мРНК)	↓GUGCG		Y_nAU↓
мРНК хлоропластов (*Euglena*)	↓GUG$^{C}_{U}$G		Y_nA$^{U}_{C}$↓

[1)] Представлены последовательности РНК. Y – пиримидин, *n* – число пиримидинов, R – пурин. Инвариантные основания подчеркнуты; стрелками показаны сайты сплайсинга. [T. Cech, Cell **44** (1986), p. 207.]

- Сплайсинг сайтында канондық тізбектің болуы осы интронның үнемі жойылатындығын білдірмейді.

- Кейбір жағдайда сплайсинг сайтының бір немесе екі көрсетілген тізбектері интрон мен эконда болады, бұл жағдайда сплайсинг жүрмейді.

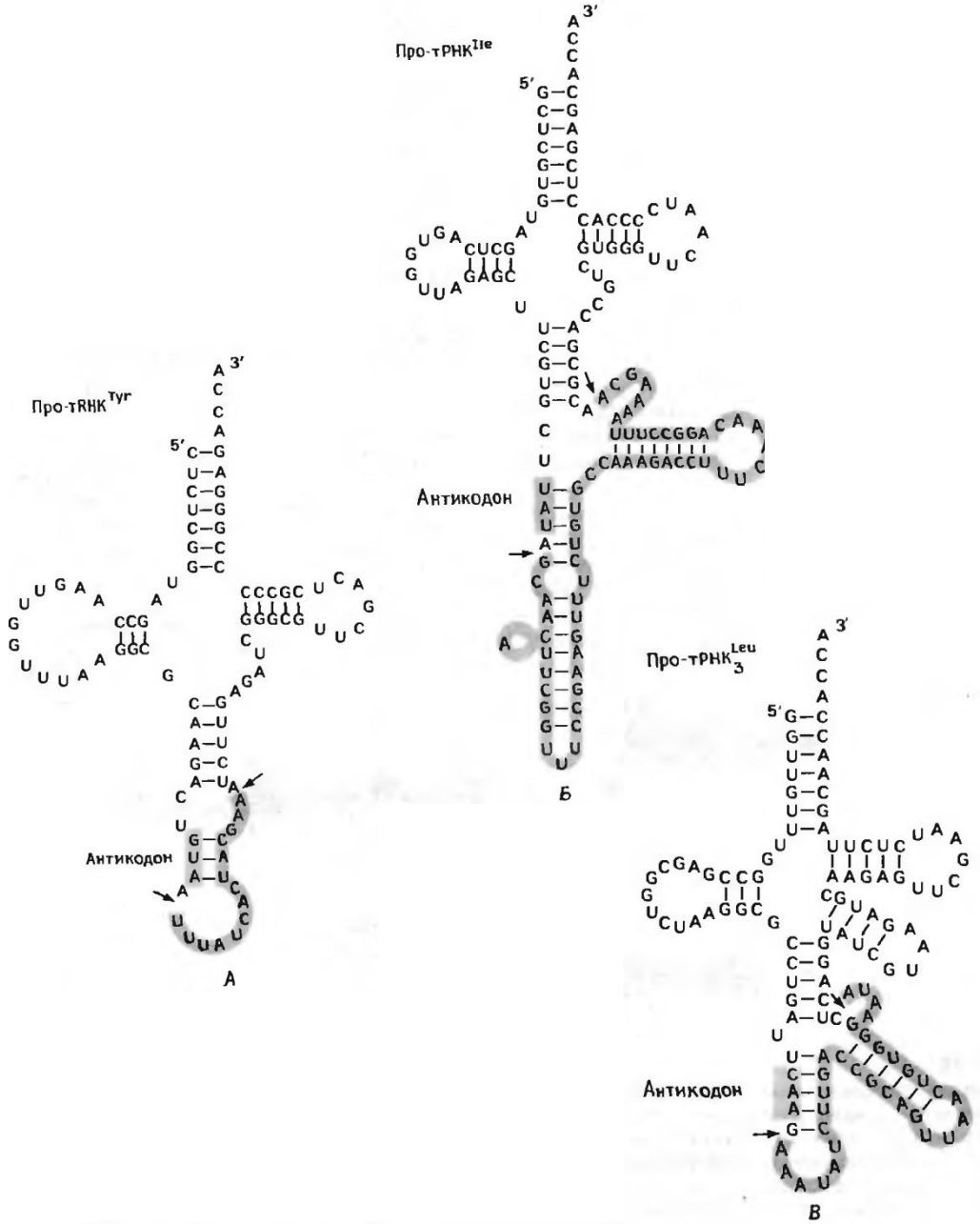
- Алайда кейбір жағдайларда бұндай криптикалық сайттар бәрібір жұмыс жасайды (мысалы, нағыз сайттар өзгерген немесе жоқ болуы мүмкін болған жағдайда).

тРНҚ геніндегі интрондар

- тРНҚ геніндегі интрон өлшемі 14-тен шамамен 60 нуклеотид аралығында ауытқып тұрады, бірақ олар бір жерде орналасады, яғни антикодонның 3’-ұшынан бір нуклеотид арқылы.

- Негізінен егер осы тРНҚ –ның генінде интрон болса, онда осы тРНҚ-ны кодтайтын түрлердің аумағында барлық басқа гендер осындай интроннан тұрады.

- Алайда әртүрлі тРНҚ-ны кодтайтын гендерде интронның ішкі және флангтік бөліктері бір бірінен ерекшеленеді.



Расположение интронов в тРНК и места их сочленений.

I -ші топ интрондары

- I –ші топ интрондары кейбір төмен сатыдағы эукариоттардың ядролық рРНҚ генінде болады (мысалы, Tetrahymena thermophila және Physarum polycephalum), ашытқылар, саңырауқұлақтар және хлоропластар мен митохондрия рРНҚ генінде және ашытқылар мен саңырауқұлақтардың кейбір митохондриялық мРНҚ-сында, жоғары сатыдағы өсімдіктердің тРНҚ-сында, Т4 фагының тимидилатсинтетаза генінде болады.

- I топ интрондарының жалпы сипаты мынандай:
- 1. қандай да бір белоктың қатыспауынсыз in vitro –да жүретін өзінің сплайсингін өздері катализдейді.
- 2. сплайсингке қажетті ақпарат интронның ішінде көп болады, олар молекуланың қойылуын кеңістіктік құрылым түзу арқылы қамтамасыз етеді.
- 3.Сплайсинг бос гуанозин немесе кез келеген оның 5’-фосфорланған туындылары арқылы инициацияланады.
- 4. сплайсингтің соңғы өнімі болып рРНҚ және сызықты рРНҚ табылады, олардың өлшемдері интрон өлшеміне қарағанда бірнеше есе кіші.

- I класс интрондарының құрылысының негізгі ерекшеліктері әрқайсысының ұзындығы шамамен 10 нуклеотидтен тұратын 4 нуклеотидті тізбек арқылы анықталады.

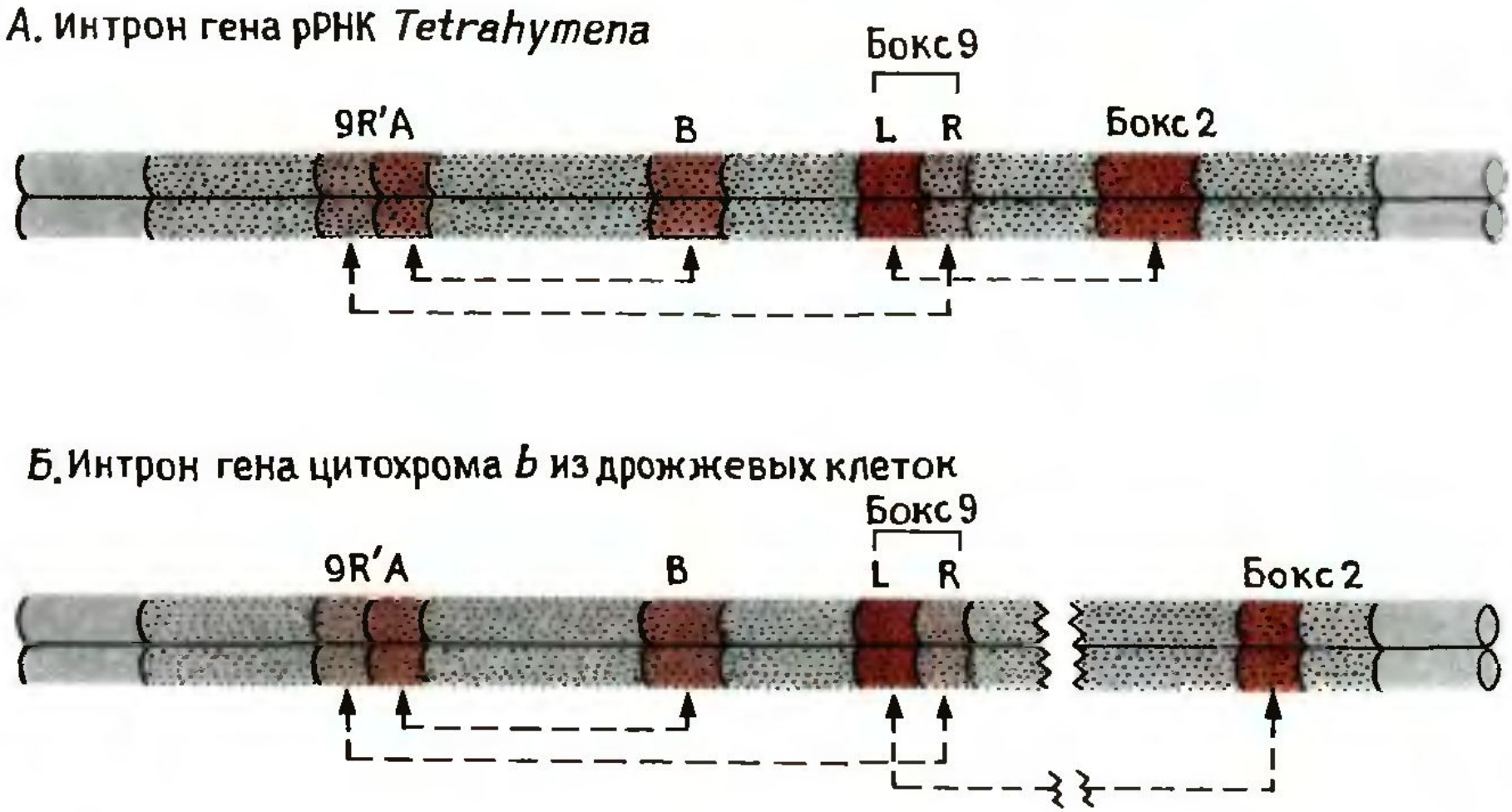
- Нуклеотидтердің молекулаішілік жұптасуының нәтижесінде интрон автокатализдік сплайсинг үшін қолайлы конфигурацияға ие болады.

- Химиялық модификация сияқты осы консервативті жұптасқан тізбектердің ішіндегі нақты сайттардағы бағытталған ауысулар сплайсингке қабілеттіліктің біртіндеп және толығымен жоғалуына әкеп соғады.

Таблица 8.5. Консервативные элементы, присутствующие во многих интронах группы I [1)]

Элемент	Синоним	Каноническая последовательность	Комплементарность
9R′	E	Не консервативен	Бокс9R
A	P	AUGCUGGAAA	B
B	Q	AAUCAGCAGG	A
Бокс9L	R	UCAGAGACUACA	Бокс2
Бокс9R	E′	Не консервативен	9R′
Бокс2	S	AAGAUAUAGUCC	Бокс9L

[1)] Подчеркнута та часть канонической последовательности, которая предположительно участвует в образовании нуклеотидных пар. [T. Cech, Int. Rev. of Cytology **93** (1985), p. 3.]



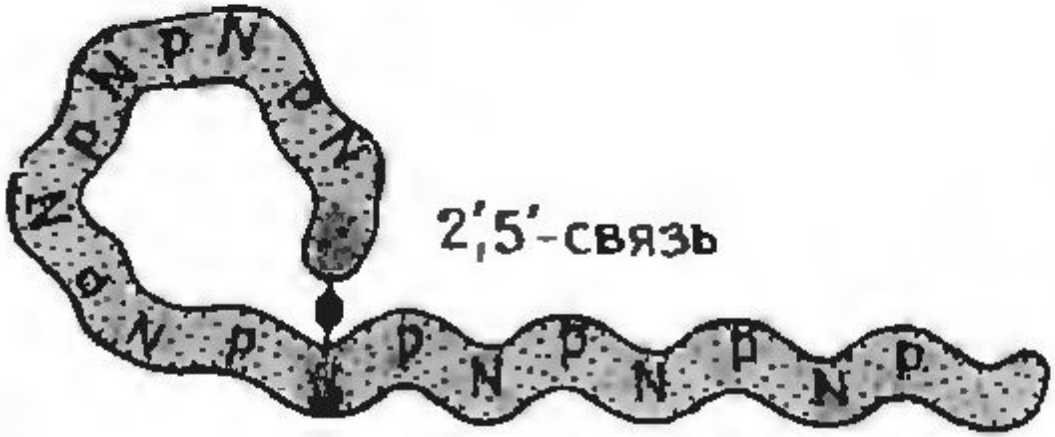
- I -ші кластың ядролық және митохондриялық интрондарының консервативті тізбегінің ұйымы

I I топ интрондары

- I I топ интрондары ашытқының қос митохондриялық генінен табылған. Олар цитохромоксидазаның және цитохром b-ның бір суббірлігін коделейді. Осы гендерде сонымен қатар I топ интрондары да бар.

- I топ интрондары мен I I топ интрондарының ұқсастығы мен айырмашылығы:

- 1. I I топ интрондарында I топ интрондарына тән канондық тізбек жоқ, бірақ олар да негіздердің молекулаішілік жұптасуының арқасында түзілген арнайы екіншілік құрылымға ие.
- 2. I I топ интрондары сонымен қатар самосплайсингке ұшырайды, бірақ бұл жағдайда реакция экзогендік гуанозинмен емес, керісінше интронның құрамына кіретін қалдықпен инициацияланады.
- 3. сплайсинг кезінде I топ интрондарында аралық сақиналы формалар түзіледі және сызықты соңғы өнімдер түзіледі, ал I I топ интрондары ішкі нуклеотидтің 2’-гидроксилдік тобының фосфодиэфирлі байланыс арқылы РНҚ интронының 5’-ұшы фосфатымен қосылған арқан тәрізді құрылымы ретінде болады.



- 2‘,5‘-фосфодиэфирлі байланыстардың бір бірінен белгілі арақашықтықта орналасқан нуклеотидтерінің арасында табылуы

Автокатализдік сплайсингтің көмегімен кесілген интрондар

- Самосплайсинг – бұл реттелген процесс, ол фосфодиэфирлік алмасудың тізбекті автокатализдік реакциясынан тұрады.

- Онда ол РНҚ рибозим ферменті сияқты молекулаішілік жағдай туғыза отырып және трансэтерификацияның реттелген арнайы реакциясының бүкіл сериясы үшін реакциялық топтарды орналастыра отырып, қызмет атқарады.

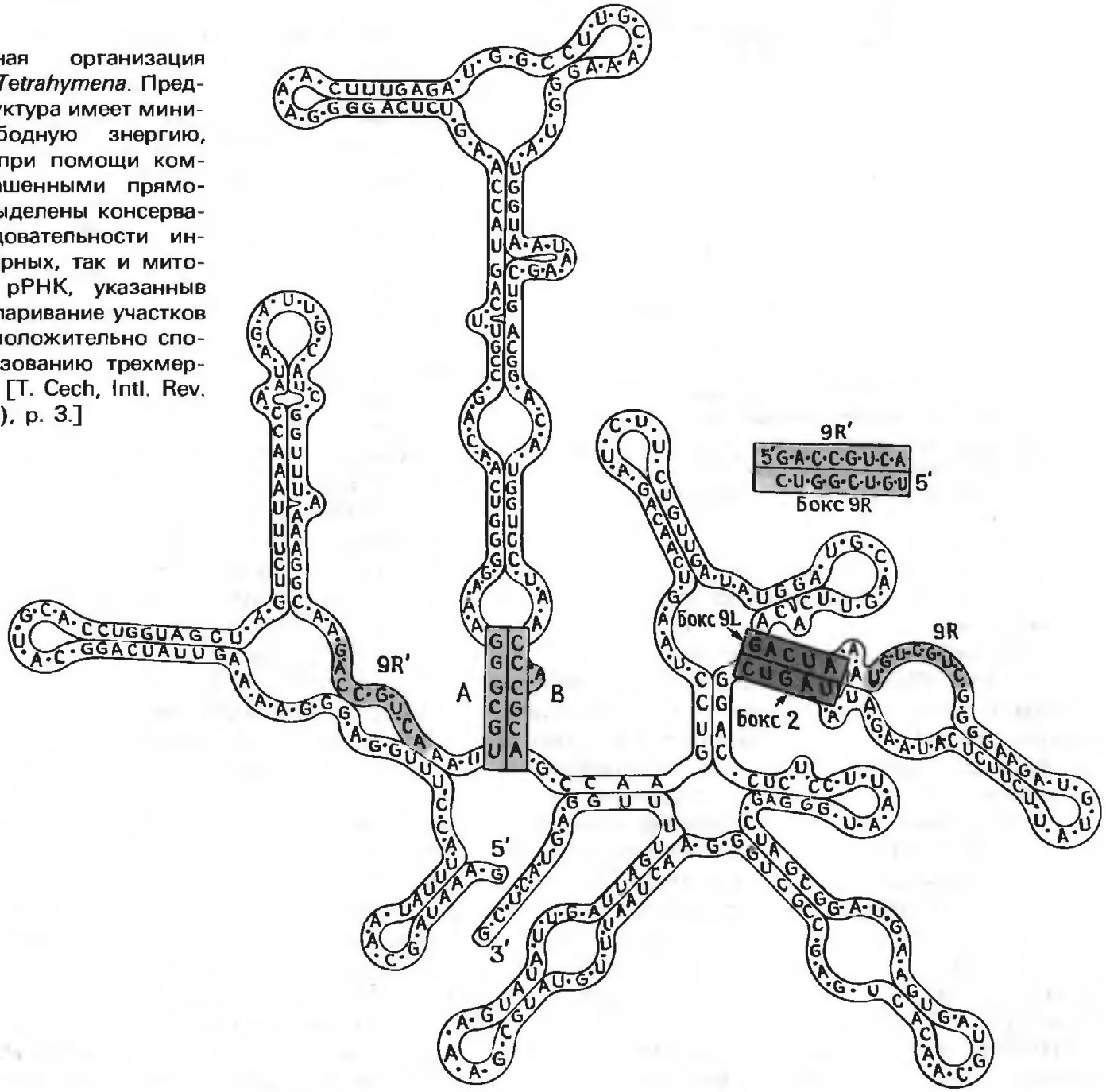
I топ интрондарының самосплайсингі

- 1. интронға гуанозиннің қосылуы.
- 2. байланысқан гуанозиннің 3’-гидроксилдік тобының бөлінбеген жұп электрондары экзонмен бірге интронның 5‘-жүйелену орнында фосфатты топты атқылайды, ол РНҚ молекуласының нуклеофилдік ыдырауына әкеледі.
- 3. Ыдырау сайтында түзілген 3’-гидроксилдік топ фосфаттық топпен интрон мен экзонның 3’-жүйелену орнында әсер етеді, кейін экзонның екі бөлігінің 413 нуклеотидтен тұратын сызықты интронының босап шығуы арқылы лигирленуі жүреді.
- 4. бұл сызықты интрон процестелген интронның түзілуі арқылы бірінші 15, кейін 4 нуклеотидтің жаңқалауына әкелетін гидролизбен жүретін молекулаішілік трансэтерификацияның екі тізбекті реакциясына ұшырайды; бір диэфирлі байланыстың бұзылуы осындай байланыстың бір мезгілде түзілуімен орны толтырылады.
- 5.интронның иілуі болады, ол кезде екі жүйеленудің орны бір біріне жақын болады, яғни шамамен гуанозинді байланыстыру сайтының маңайында. Интрон екі жүйелену орындарында экзон тізбектермен жұптасуға қабілетті тізбектен тұрады деп болжау жасауға болады.
- 6.босап шыққан сызықты интронда осы элементтің циклизациясын жеңілтететін конформациялық өзгерістер жүреді.

- Ашытқылардың митохондриясының про-мРНҚ генінің I -ші топ кейбір интрондарындағыin vitro сплайсинг Tetrahymena про-рРНҚ сплайсингке қатысатын консервативті тізбектерге тәуелді болады.

- Бұл жағдайда интрондардың алынуы транс-әсер етуші белоктарға тәуелді болады, олар сол немесе ұқсас гендердің ішкі тізбегімен кодталады және экзондар мен интрондар үшін ортақ оқу рамкасына ие.
- Матураза деп аталатын бұндай белоктар қысқа тіршілік ететіндерге жатады, мүмкін олар РНӨ әсерімен сплайсингті жеңілдететін құрылымның түзілуі арқылы про-мРНҚ интронының қойылуына көмектеседі .

РИС. 8.77.
Пространственная организация интрона рРНК *Tetrahymena*. Представленная структура имеет минимальную свободную энергию, рассчитанную при помощи компьютера. Окрашенными прямоугольниками выделены консервативные последовательности интронов как ядерных, так и митохондриальных рРНК, указанныв на рис. 8.75. Спаривание участков 9R и 9R′ предположительно способствует образованию трехмерной структуры. [T. Cech, Intl. Rev. Cytol. **93** (1985), p. 3.]



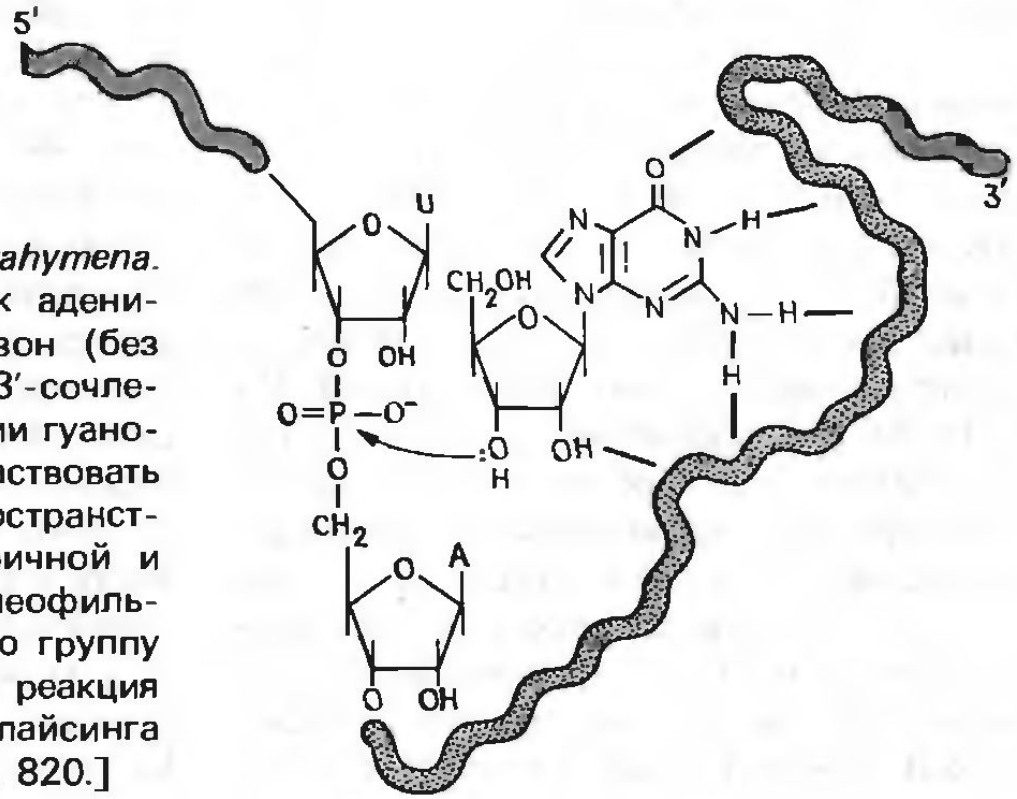
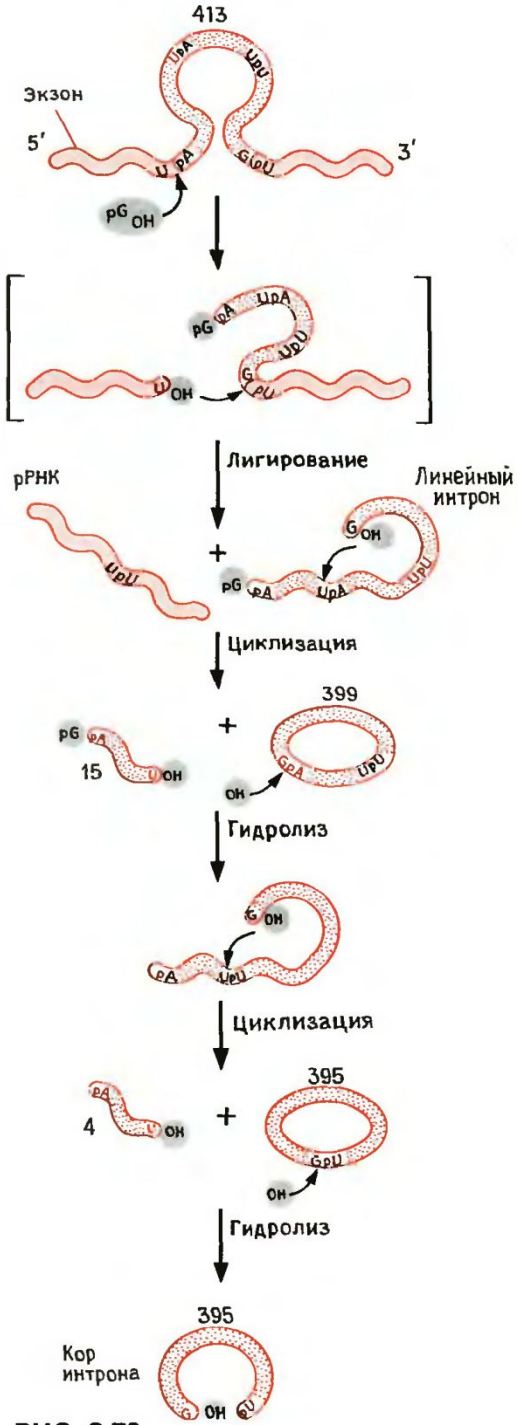
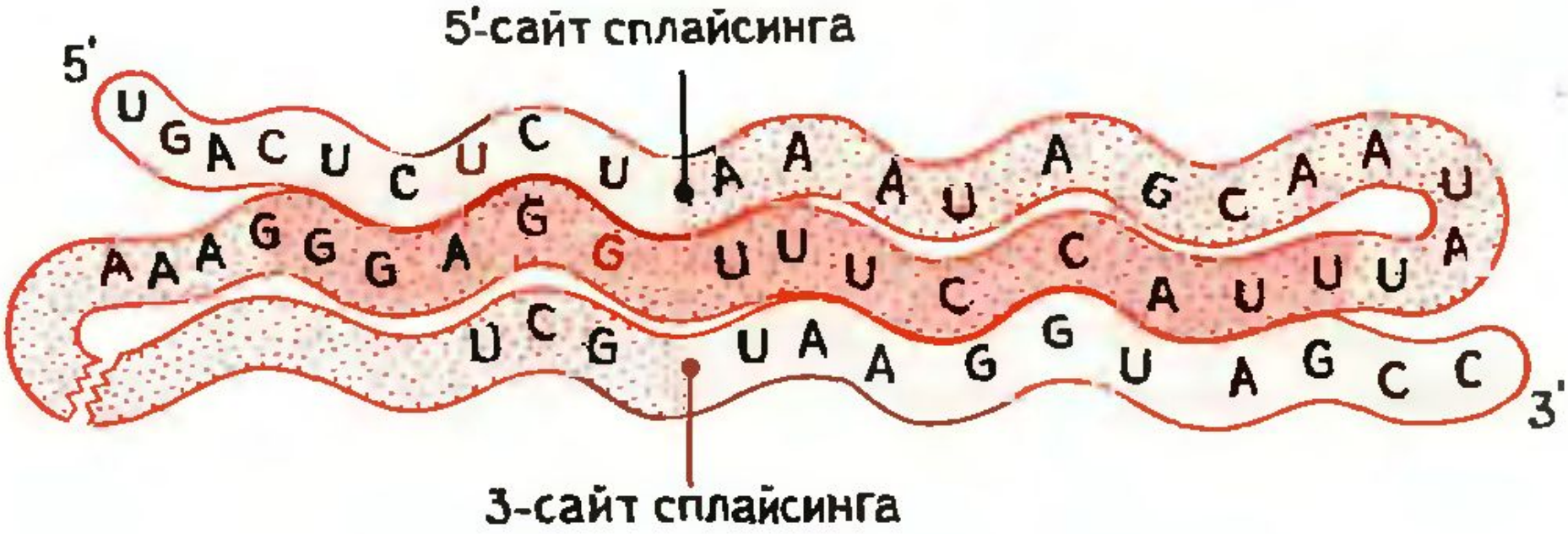


РИС. 8.78.
Сайт связывания гуанозина в интроне тРНК *Tetrahymena*. Интрон (выделен точками) содержит остаток адениловой кислоты в месте 5'-сочленения, а экзон (без точек) – остаток уридиловой кислоты в месте 3'-сочленения. В представленном на рисунке связывании гуанозина при помощи водородных связей могут участвовать различные основания, сахара или фосфаты, пространственно сближающиеся при образовании вторичной и третичной структуры. Стрелкой показана нуклеофильная атака 3'-гидроксила рибозы на фосфатную группу в 5'-сайте сплайсинга. По-видимому, эта реакция трансэтерификации является началом самосплайсинга РНК. [B. L. Bass, T. Cech, Nature **308** (1984), p. 820.]



- I-ші топ интрондарының самосплайсингі, Tetrahymena thermophila рРНҚ интроны мысал ретінде



- Интрондағы «ішкі бағытталған тізбек» (ол қанық емес боялған) екі экзон-интронды жүйені жақындастырады

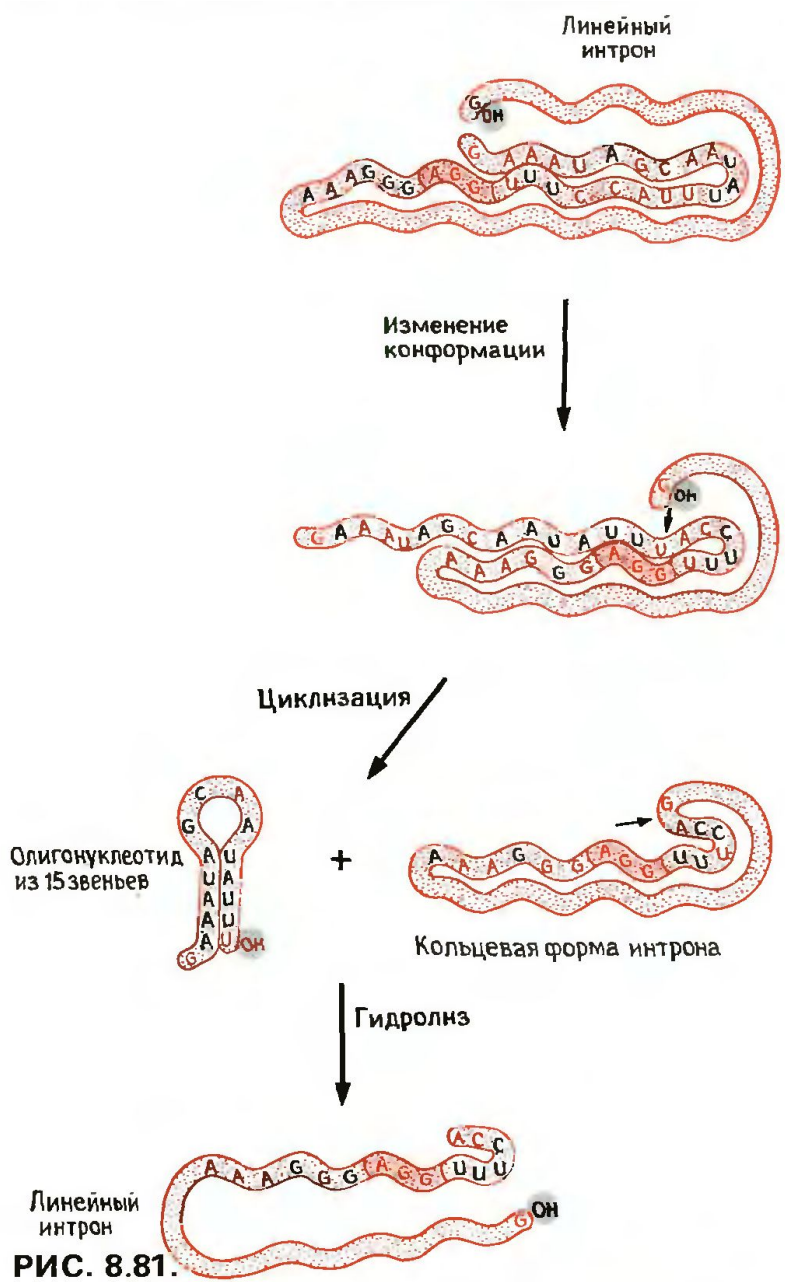


РИС. 8.81.

- Кесілген интронның альтернативті молекулаішілік жұптасуы одан олигонуклеотидтер мен циклизацияны алып тастайды.

II –ші топ интрондарының сплайсингі

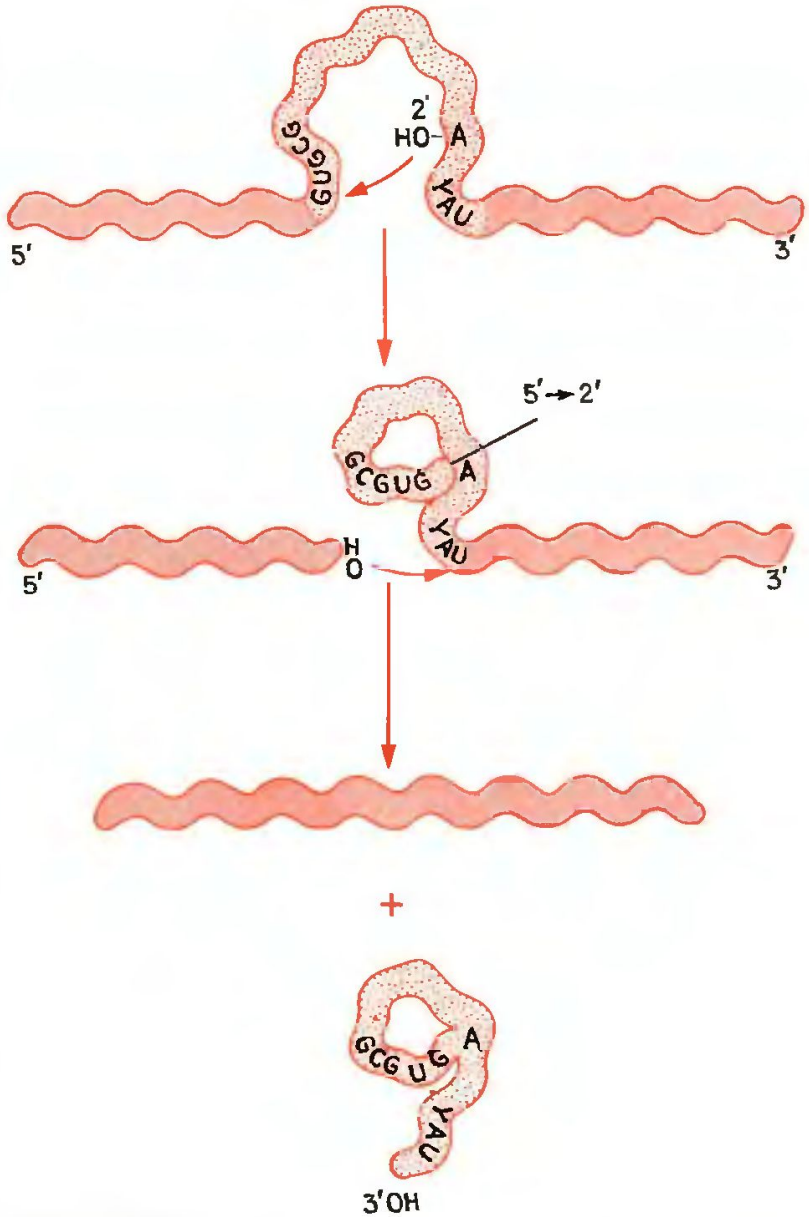
- Сплайсинг механизмінің екі ерекшелігі:
- 1. II –топ интрондарының сплайсингі үшін нуклеозид-инициатор керек емес.
- 2. сплайсинг нәтижесінде арқан типіндегі құрылым түзіледі.

- Сплайсинг негізінен трансэтерификацияның қатысуы арқылы жүреді:
- 1. сплайсингтің 5’-сайтының ыдырауы болады.
- 2. сплайсингтің 3’-сайтының ыдырауы және екі экзондардың лигирленуі.

- Атқылаушы нуклеофил - ол нуклеотидтің интронның ішінде орналасқан 2’-гидроксилді тобы.

- Арқан тәрізді құрылым жаңа 2’-, 5’-фосфодиэфирлі байланыстың РНҚ тізбегінің орта бөлігінде түзілуі кезінде тундайды.

- Спонтанды түрде немесе белоктардың қатысуымен қалыптасқан үшөлшемді интрон құрылымы мынандай болуы керек, яғни ол кезде трансэтерификация белсенділігі үшін қажетті сплайсингтің 5’-сайтының және 2’-гидроксильді тобының жақындасуы болуы тиіса.
- Ыдырауына жататын нуклеотидаралық байланыстарды таңдау интронның 5’-ұшында GUGCG тізбегі арқылы, ал II-ші топ тинтрондары үшін интронның 3’-ұшындағы YAU тізбегі арқылы анықталады.



Сплайсинг интронов группы II. 2'-гидроксильная группа остатка A осуществляет нуклеофильную атаку на остаток G и инициирует расщепление в 5'-сайте сплайсинга.