

# Uređivanje RNA i razvoj živčanog sustava kod glavonožaca

---

Štulić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:740695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA**

**Katarina Štulić**

**UREĐIVANJE RNA I RAZVOJ ŽIVČANOG SUSTAVA**  
**KOD GLAVONOŽACA**

**Završni rad**

**Split, rujan 2018.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA**

**UREĐIVANJE RNA I RAZVOJ ŽIVČANOG SUSTAVA**  
**KOD GLAVONOŽACA**

**Završni rad**

**Predmet:** Molekularna biologija

**Mentor:**

Doc. dr. sc. Željka Trumbić

**Student:**

Katarina Štulić

**Split, rujan 2018.**

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel za studije mora  
Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora

Završni rad

## UREĐIVANJE RNA I RAZVOJ ŽIVČANOG SUSTAVA KOD GLAVONOŽACA

Katarina Štulić

### Sažetak

Glavonošci podrazreda Coleoidea posjeduju najrazvijeniji živčani sustav među beskralježnjacima. Smatra se da je njegov razvoj na molekularnoj razini rezultat određenih specifičnosti pronađenih za ovu skupinu, kao što je ekspanzija protokaderina u genomu, intenzivne aktivnosti transpozona i RNA uređivanja. Uređivanje RNA, post-transkripcijski mehanizam koji omogućava nastanak različitih proteina neovisno od genetičkog koda, izrazito je zastupljeno kod ovih organizama, i pokazuje tkivnu-specifičnost: dvostruko više modifikacija je zabilježeno u živčanom nego u ne-živčanom tkivu. Deaminacija adenzina u inozin, koju katalizira enzimska obitelj adenzinskih deaminaza specifičnih za RNA (ADAR) je karakteristični tip uređivanja za ovu skupinu. Sami ADARi su također podložni uređivanju, a kod lignje je pronađena ADAR2 izoforma s dodatnom domenom koja povećava njegovu aktivnost. Intenzivno uređivanje je uočeno i na naponskim kalijevim kanalima koji u neuronima imaju ulogu u ekscitabilnosti. Također, utvrđen je utjecaj RNA uređivanja na regulaciju brzine Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaza. Suprotno slučaju kod sisavaca, RNA uređivanje se kod glavonožaca događa na kodirajućim regijama što omogućava rekodiranje transkriptoma i diversifikaciju proteoma, ali usporava brzinu konvencionalne evolucije na razini DNA.

(22 stranice, 13 slika, 22 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

**Ključne riječi:** RNA uređivanje, glavonošci, živčani sustav, protokaderini, kalijevi kanali

**Mentor:** Doc. dr. sc. Željka Trumbić

**Ocjenjivači:** 1. Doc. dr. sc. Zvezdana Popović Perković  
2. Doc. dr. sc. Željka Trumbić  
3. Doc. dr. sc. Mirela Petrić

University of Split  
Department of Marine Studies  
Undergraduate study Marine Biology and Ecology

BSc Thesis

## RNA EDITING AND NERVOUS SYSTEM EVOLUTION IN CEPHALOPODS

Katarina Štulić

### Abstract

Cephalopods in the subclass Coleoidea possess most developed nervous system among the invertebrates. At the molecular level, it is considered that its evolution is associated with several features: expansion of the protocadherin gene family in the genome, high transposon activity and RNA editing. RNA editing, a post-transcriptional mechanism that allows the formation of different proteins independent of the genetic code, is highly represented in these organisms and exhibits tissue-specificity: twice as much modifications were observed in the nervous than in the non-nervous tissue. Deamination of adenosine to inosine, catalysed by the ADAR-specific adenosine deaminase family, is a typical type of editing for this group. ADARs themselves are also susceptible to editing, and in the squid an ADAR2 isoform was found harbouring an extra domain which increases its activity. Intensive editing was also observed for voltage gated potassium channels that in neurons play a role in excitability. Also, RNA editing affects the speed of Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPase transporters. Contrary to mammalian case, RNA editing in cephalopods is characteristic for the coding regions, which allows recoding of transcriptome and proteome diversification, but slows the speed of conventional DNA evolution.

(22 pages, 13 figures, 22 references, original in: Croatian)

**Keywords:** RNA editing, cephalopods, nervous system, protocadherine, potassium channels

**Supervisor:** Željka Trumbić, PhD / Assistant Professor

**Reviewers:**

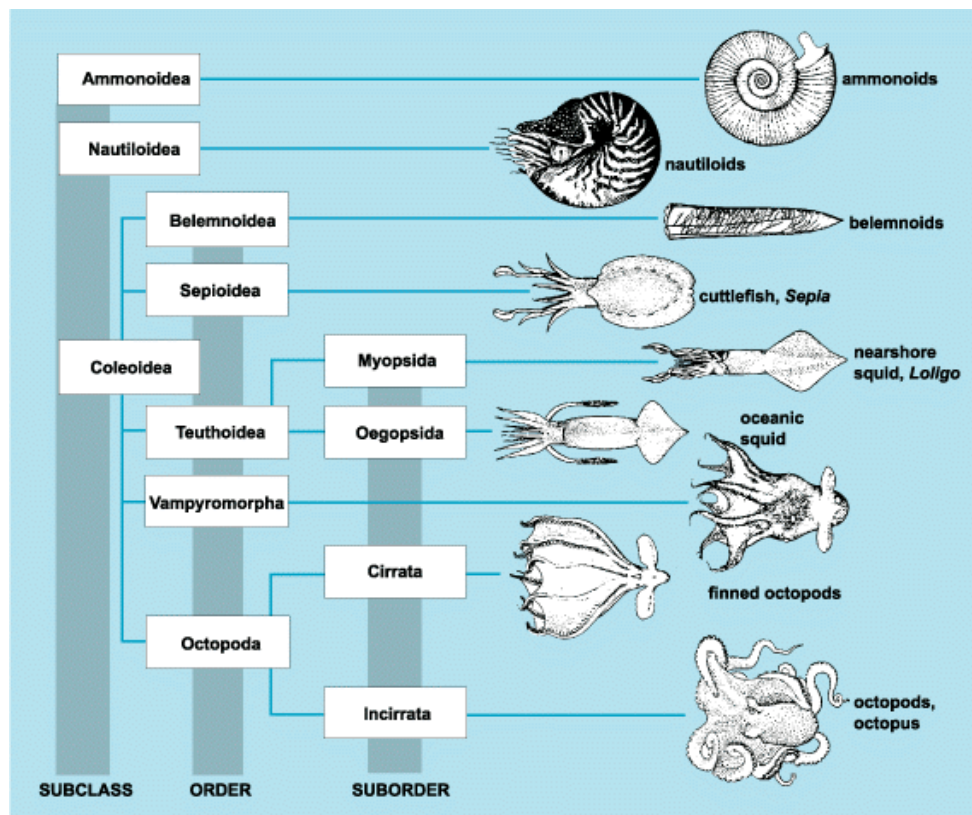
1. Zvezdana Popović Perković, PhD / Assistant Professor
2. Željka Trumbić, PhD / Assistant Professor
3. Mirela Petrić, PhD / Assistant Professor

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. RAZRADA TEME .....	4
2.1. Organizacija živčanog sustava.....	4
2.2. Karakteristike genoma <i>Octopus bimaculoides</i> .....	7
2.5. Uređivanje RNA kod glavonožaca.....	8
2.5.1. Adenzinske deaminaze specifične za RNA (ADAR) .....	13
2.5.2. Protokaderini.....	15
2.5.3. Ionski kanali.....	17
3. ZAKLJUČCI .....	20
4. LITERATURA .....	21

# 1. UVOD

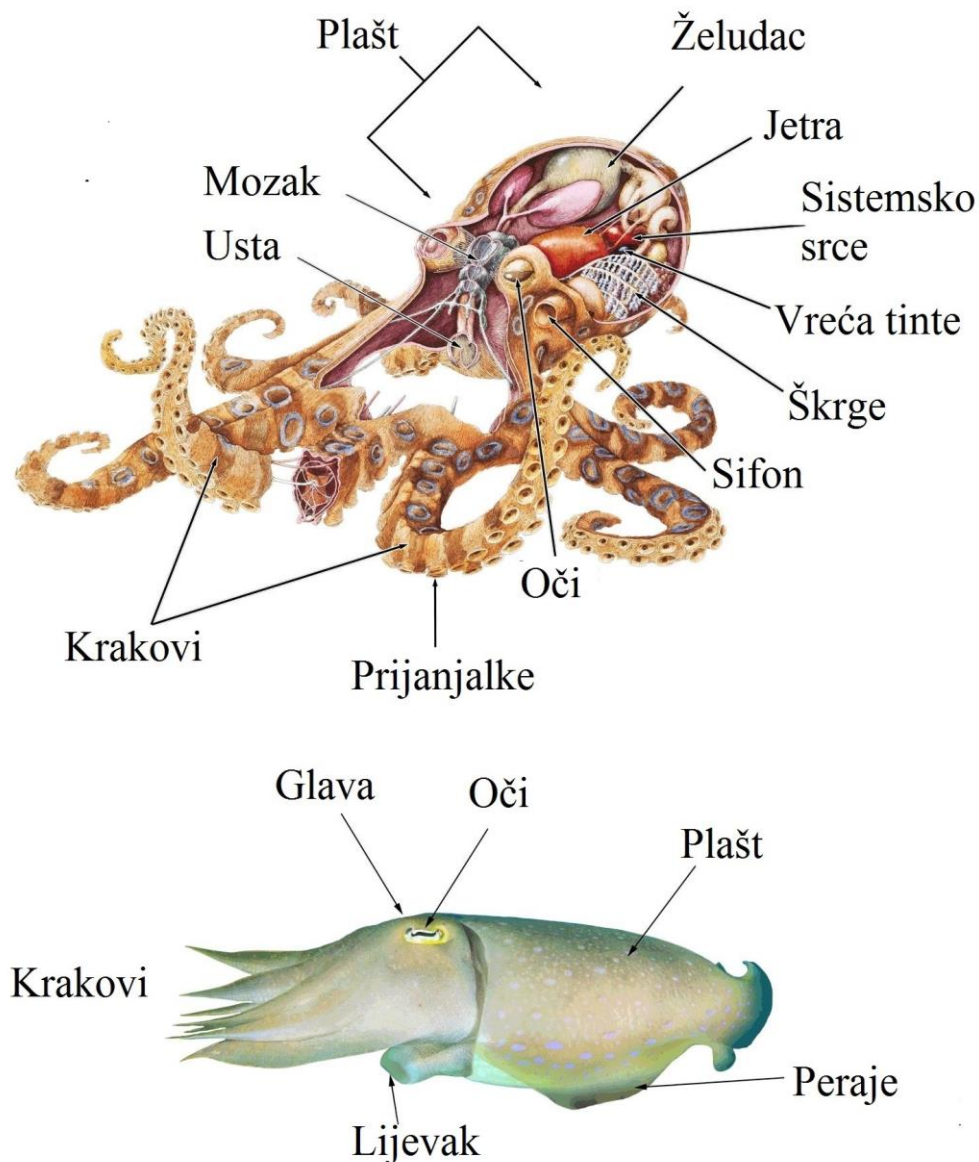
Glavonošci (Cephalopoda Cuvier, 1797) su razred unutar koljena mekušaca (Mollusca). Osim izumrlag podrazreda Ammonoidea, taksonu pripadaju i dva živa podrazreda, Coleoidea i Nautiloidea (Slika 1). Za razliku od primitivnijih Nautiloidea, skupina Coleoidea je karakteristična po tome što nije zadržala vanjsku ljušturu kakvu pronalazimo kod drugih pripadnika mekušaca, već je ona reducirana i nalazi se unutar tijela kao rudiment ili je potpuno odsutna (Brusca i Brusca, 2001).



**Slika 1.** Pojednostavljeno filogenetsko stablo glavonožaca (izvor: <https://qph.ec.quoracdn.net/main-qimg-7fabec04f690f1ca022f9d160cc7951a>).

Na tijelu glavonožaca razlikujemo trup obavijen plaštom koji zatvara plaštanu šupljinu unutar koje su smješteni unutarnji organi, vratni dio te glavu s prijanjajućim krakovima (Slika 2). Prema broju krakova, Coleoidea dijelimo na osmerokračnjake (Octopodiformes), među koje ubrajamo hobotnice, nautiluse i bobuljce (redovi Octopoda i Vampyromorpha), dok deseterokračnjacima (Decapodiformes) pripadaju sipe, lignje i bobići (redovi Sepiida, Sepiolida, Spirulida, te Myopsida i Oegopsida koji su prije bili poznati pod nazivom

Teuthida) (MolluscaBase, 2018). Druga podjela se određuje na temelju broja škrga u plaštanoj šupljini. Tako razlikujemo dvoškržnjake i četveroškržnjake. Od četveroškržnjaka su još jedino živi pripadnici Nautiloidea.



**Slika 2.** Anatomija i građa predstavnika glavonožaca, hobotnice (gore) i sipe (dolje) (izvor: <http://reeflifeapps.com/wp-content/uploads/2016/05/EduCephalopod-2.png>).

Glavonošci podrazreda Coleoidea su aktivni, snalažljivi grabežljivci s bogatim repertoarom ponašanja. Protok vode kroz plašt uz kontrakcije mišića omogućava im kretanje na "mlazni pogon" što ih čini učinkovitim predatorima. Imaju kromatofore unutar kojih se nalazi citoelastična vrećica s pigmentom za koju su vezani setovi radijalnih mišića sa živcima.



Smješteni su u površinskom sloju kože i pod direktnom su kontrolom živčanog sustava, a omogućuju promjenu boje i teksture u svrhu prikrivanja i komunikacije (Brusca i Brusca, 2001). Coleoidea posjeduju najrazvijeniji živčani sustav među beskralješnjacima. Mozak se nalazi omotan oko jednjaka (Slika 2) te je uočljiva nabranost režnjeva s jasno vidljivim granicama. Neuron su unipolarnog tipa, a akcijski potencijal se generira samo kod prijelaza na aksone. Kod hobotnica mozak čine srasli neuralni gangliji, a živčani sustav u cijelosti sadrži oko 500 milijuna živčanih stanica što premašuje čak i veliki broj kralježnjaka (Young, 1971). Optički režnjevi i krakovi su preko malog broja živčanih vlakana povezani s mozgom, odnosno u mozak se šalju visoko obrađene informacije iz samih krakova. Glavonošci su sposobni za učenje i složene kognitivne funkcije te se mnogi koriste kao modeli u neurofiziološkim istraživanjima (Hochner i sur., 2006).

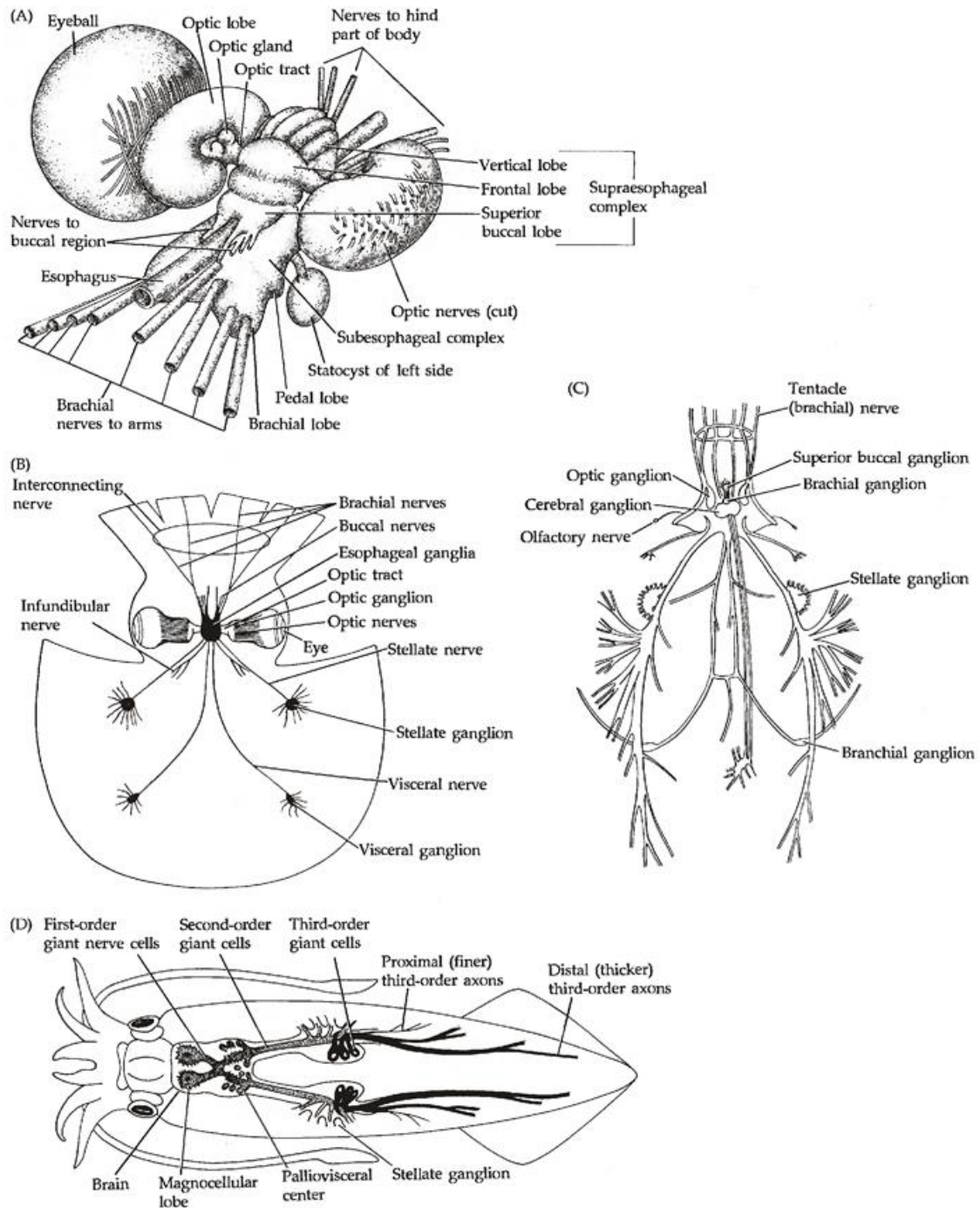
Molekularna osnova ovih kompleksnih i naprednih karakteristika se također intenzivno istražuje. Razvoj metoda sekvenciranja druge generacije je omogućio sastavljanje prvog genoma iz skupine Coleoidea; 2015. godine je sekvenciran genom hobotnice *Octopus bimaculata* (Albertin i sur., 2015), dok su Alon i sur. (2015) uspoređujući transkriptom i fragmente genoma lignje *Doryteuthis pealeii* uočili neobično visoku stopu RNA uređivanja. Rezultati ovih studija upućuju na neke od zanimljivih molekularnih osnova naprednog živčanog sustava kod Coleoidea.

## 2. RAZRADA TEME

### 2.1. Organizacija živčanog sustava

Unatoč složenosti, živčani sustav glavonožaca slijedi osnovni plan koji nalazimo kod svih mekušaca, a koji se sastoji od pet do šest pari ganglija; cerebralni, bukalni, pedalni, pleuralni, parietalni i visceralni. Lijevi i desni parovi su povezani komisurama, dok konektive povezuju ganglije jedne strane od sprijeda prema natrag (Budelmann, 1995). Kod glavonožacama je došlo do skraćivanja komisura i konektiva, što je omogućilo bolju komunikaciju između neurona, te do centralizacije i encefalizacije sustava. Živčani sustav glavonožaca je podijeljen je na središnji i periferni dio. Središnji dio se sastoji od razvijenog mozga i optičkih režnjeva, a periferni dio uključuje živčani sustav tijela i krakova (Slika 3). Mozak je postavljen oko jednjaka i sastoji se od režnjeva od kojih su neki dodatno podijeljeni, a ima ih ukupno oko 40 (Young, 1971). Većina režnjeva nema zasebnu funkciju, dvosmjerno su povezani što omogućuje visoku razinu interakcije i odstupanje od klasične hijerarhijske organizacije kakvu nalazimo kod kralježnjaka. Vertikalni, subvertikalni, subpendukularni, prekomisuralni, frontalni i dijelovi posteriornih bukalnih režnjeva, kao i optički režnjevi, su uključeni u analizu osjetilnih informacija, vida, učenja te kratkotrajnog i dugotrajnog pamćenja. Različiti bazalni i pedunkularni režnjevi su motorni centri, lateralni bazalni režanj kontrolira kromatofore, a viši bukalni režanj aktivnost hranjenja. Magnocelularni režanj se može opisati kao srednji motorni centar zadužen za obranu i brze reakcije (Budelmann, 1995).

Trećina svih živčanih stanica je smještena u centralnom živčanom sustavu, 40-45 milijuna u mozgu i 120-180 milijuna u optičkim režnjevima, dok se dvije trećine, oko 350 milijuna, nalaze u perifernom živčanom sustavu, većinom živčanim vlaknima i ganglijima krakova, te može funkcionirati vrlo autonomno što je u vezi s kompleksnim radnjama i koordinacijom krakova koji funkcioniraju bez potpore tvrdog kostura (Budelmann, 1995). Svi periferni gangliji su niži motorni centri, a najpoznatiji je zvjezdasti ganglij koji inervira plašt i kontrolira njegovo pokretanje (Slika 3).



**Slika 3.** Visoko razvijeni živčani sustav glavonožaca. **A)** Mozak hobotnice. **B)** Živčani sustav hobotnice. **C)** Živčani sustav lignje (*Loligo*). **D)** Veliki sustav živčanih vlakana kod lignje (Brusca i Brusca, 2003).

Živčani sustav oktopoda i dekapoda se značajno razlikuju od primitivnijeg *Nautilus*, dok i među njima postoje razlike koje su odraz razlika u ponašanju i životnim sredinama (Slika 3). Mozak oktopoda je više centraliziran u odnosu na dekapodni te su branhijski i pedalni režnjevi udruženi kao što je slučaj i sa višim bukalnim i nižim frontalnim režnjem. Branhijski, pedalni i niži frontalni režnjevi su kod oktopoda također veći nego kod dekapoda, vjerojatno zbog preciznijeg korištenja krakova i taktalnog učenja koje primjenjuju (Slika 3 A i B). Suprotno tome, dekapodi imaju veće optičke, bazalne i vertikalne režnjeve, pojednostavljeni niži frontalni sustav i izostanak supra-branhijske komisure. Dekapodi posjeduju i dodatni režanj za kontrolu peraja (Slika 3 C i D). Za dekapode je karakterističan i sustav velikih vlakana (Slika 3D). Radi se o tri velika neurona (neuroni prvog, drugog i trećeg reda) čija tijela dosežu i 150  $\mu\text{m}$  u promjeru, a promjer aksona i 1 mm, koji se nižu jedan na drugoga i tvore sponu između mozga, zvjezdastog ganglija i inervacije plašta (Budelmann, 1995).

Iako su evolucijski udaljeni, živčani sustav glavonožaca i kralježnjaka pokazuju sličnosti za koje se smatra da su rezultat konvergentne evolucije vođene razvojem naprednih kognitivnih karakteristika kao pamćenje i učenje. Određena područja mozga glavonožaca pokazuju izrazito sličnu morfološku organizaciju s područjima mozga kralježnjaka sa sličnom funkcijom. Na primjer, tri kortikalna sloja optičkog režnja glavonožaca organizirana su slično dubljim slojevima mrežnice kralježnjaka (Young, 1971). Prednji bazalni i pedunkularni režnjevi pokazuju sličnosti s malim mozgom kralježnjaka, dok vertikalni režanj, najviši u središnjoj hijerarhiji mozga, slični hipokampusu kralježnjaka, kako građom tako i ulogom u učenju i pamćenju (Hochner i sur., 2006). U vertikalnom režnju se nalazi jako puno malih interneurona specifičnih za živčani sustav glavonožaca, tzv. amakrini ili mikroneuroni, za koje se smatra da posreduju u stvaranju kompleksnih živčanih interakcija koje su potrebne za napredne funkcije. Hobotnica *Octopus vulgaris*, model u neurofiziologiji i proučavanju procesa pamćenja i učenja, pokazuje sposobnost učenja promatranjem (Hochner i sur., 2006), odnosno uči promatrajući druge jedinke. Učenje promatranjem potiče trag u memoriji koji je stabilan najmanje 5 dana, a ova sposobnost se gubi uklaňanjem vertikalnog režnja, dok u svakom drugom pogledu životinja normalno funkcionira (Hochner i sur., 2006).

## 2.2. Karakteristike genoma *Octopus bimaculoides*

Procijenjeno je da se genom hobotnice *Octopus bimaculoides* (Slika 4) sastoji od 2,7 gigabaza s 33638 kodirajućih gena i 45% ponavljajućih sekvenci (Albertin i sur., 2015). Genom je izrazito bogat transpozonomima, pokretnim genetičkim elementima koji mogu mijenjati svoje mjesto u genomu. Autori su pronašli i značajnu ekspresiju transpozonskih elemenata u živčanom tkivu hobotnice, a zabilježeno je i da se u blizini gena s jačom kontrolom tkivno-specifične ekspresije nalazi više transpozona. Smatra se da pojačana ekspresija transpozona u živčanom tkivu ima važnu ulogu u procesima učenja i pamćenja, međutim nije poznato točno kakvu (Erwin i sur., 2012).

Sadržaj gena kod *O. bimaculoides* je u velikoj mjeri sličan onomu koji se nalazi kod bilateralnih beskralješnjaka. Međutim, zabilježena je značajna ekspanzija nekoliko genskih obitelji uključujući protokaderine, C2H2 obitelj transkripcijskih faktora cinkovog prsta (C2H2-ZNF), gene slične interleukinu 17, receptore vezane za G protein, hitinaze i sijaline, od kojih većina ima važnu ulogu u embriogenezi i funkcioniranju živčanog sustava (Albertin i sur., 2015). Primjerice, u genomu *O. bimaculoides* je pronađeno približno 1800 C2H2-ZNF gena, od kojih je potvrđena ekspresija njih 1429. Ostali Lophotrochozoa ih imaju 200-400, a sisavci 500-700 (Liu i sur., 2014).

Suprotno očekivanjima, nisu pronađeni dokazi o ancestralnoj duplikaciji genoma kod hobotnice sličnoj onoj koja je obilježila evoluciju kralješnjaka. Albertin i sur. (2015) smatraju da su specifičnosti genoma hobotnice rezultat ekspanzije postojećih genskih obitelji, evolucije novih, modifikacije regulatornih mehanizama genoma i intenzivne aktivnosti transpozona. Doista, brojne grupe vezanih gena kod Bilateria se nisu održale kod hobotnice i u blizini ovih gena se nalazi mnoštvo transpozonskih sekvenci.

Albertin i sur. (2015) su također zabilježili povišenu stopu uređivanja RNA, post-transkripcijskog mehanizma koji omogućava nastanak različitih proteina neovisno od genetičkog koda, prethodno uočen kod lignje *Doryteuthis pealeii* (Alon i sur., 2015). Uređivanje RNA je posebno prisutno kod gena koji su uključeni u građu neurona i njihovu podražljivost, ali i drugih „housekeeping“ gena kao što je tubulin. Intenzivno korištenje ovog mehanizma za postizanje plastičnosti i diversifikacije proteina je jedna od najzanimljivijih molekularnih karakteristika Coleoidea i smatra se da je povezano s razvojem naprednog živčanog sustava.



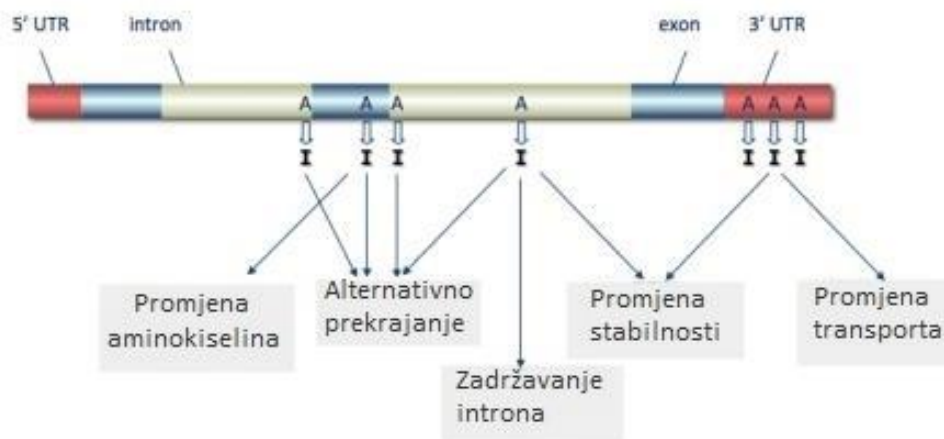
**Slika 4.** Hobotnica *Octopus bimaculoides* (izvor: [https://i.ytimg.com/vi/6VnqI\\_IZ24/maxresdefault.jpg](https://i.ytimg.com/vi/6VnqI_IZ24/maxresdefault.jpg)).

## 2.5. Uređivanje RNA kod glavonožaca

Uređivanje RNA je molekularni proces koji obuhvaća post-transkripcijsku promjenu nukleotida RNA molekule u odnosu na kodirajuću DNA (Nishikura, 2010). Nerijetko je proces ključan za uspostavljanje biološke funkcije molekula. Uređivanje se događa na kodirajućim mRNA i nekodirajućim RNA kao što su rRNA, tRNA, miRNA, srRNA, i druge. Mehanizme uređivanja RNA dijelimo u dvije glavne skupine: supstitucije i delecije/insercije (Gray, 2012). Supstitucije se odnose na zamjenu postojeće dušične baze procesom deaminacije, i to najčešće citozina u uracil ( $C \rightarrow U$ ) i adenina u inozin ( $A \rightarrow I$ ). Manje zastupljene promjene su zamjene  $U \rightarrow C$ ,  $G \rightarrow A$  i  $U \rightarrow A$ . Uređivanje RNA je karakteristično za određenu skupinu organizama te se mehanizam kao takav uglavnom ne ponavlja kod različitih skupina. To ukazuje da je sustav uređivanja stečeno svojstvo zasebne razvojne linije (Gray, 2012).

Uobičajeni oblik RNA uređivanja kod životinja, osobito glavonožaca, je deaminacija  $A \rightarrow I$  koju katalizira enzimska obitelj adenzinskih deaminaza specifičnih za RNA (ADAR). Inozin stanica tumači kao gvanozin što znači da, ako do uređivanja dođe u kodirajućim regijama koje se prevode u protein, može doći do zamjene aminokiselina i nastanka proteinskih izoformi s promijenjenim funkcijama. Biološki, ova pretvorba može imati i druge

uloge. Prvo, smatra se da nespecifična deaminacija kod dvolančanih RNA (dsRNA) sprječava invaziju virusa koji eksprimiraju dsRNA tijekom njihovog životnog ciklusa. Drugo, deaminacija adenzina u nekodirajućim mRNA regijama predložena je kao mehanizam regulacije stabilnosti poruka i ekspresije gena (Nishikura, 2010). Nadalje, ustanovljeno je da uređivanje ima važnu ulogu u regulaciji funkcije neurona. Na primjer, postsinaptična propusnost kalcija i signaliziranje G-proteina reguliraju se RNA uređivanjem ionotropnih receptora glutamata (GluR-B podjedinica), serotoninских receptora (5-HT2c) i kalijevih kanala (Nishikura, 2010). Na taj način A→I uređivanje fino podešava funkciju proteina što omogućuje veću kompleksnost u fiziološkim odgovorima, no greške u ovom mehanizmu mogu izazvati ozbiljne poremećaje. Osim promjena aminokiselina, utvrđeno je da uređivanje može utjecati na ishod prekrajanja, kao i na druge posttranskripcijske događaje kao što je 3' završna obrada, stabilnost i transport transkripata (Slika 5). Tako, A→I modifikacija ima moć da utječe na proteom na mnogo različitih načina (Nishikura, 2010).

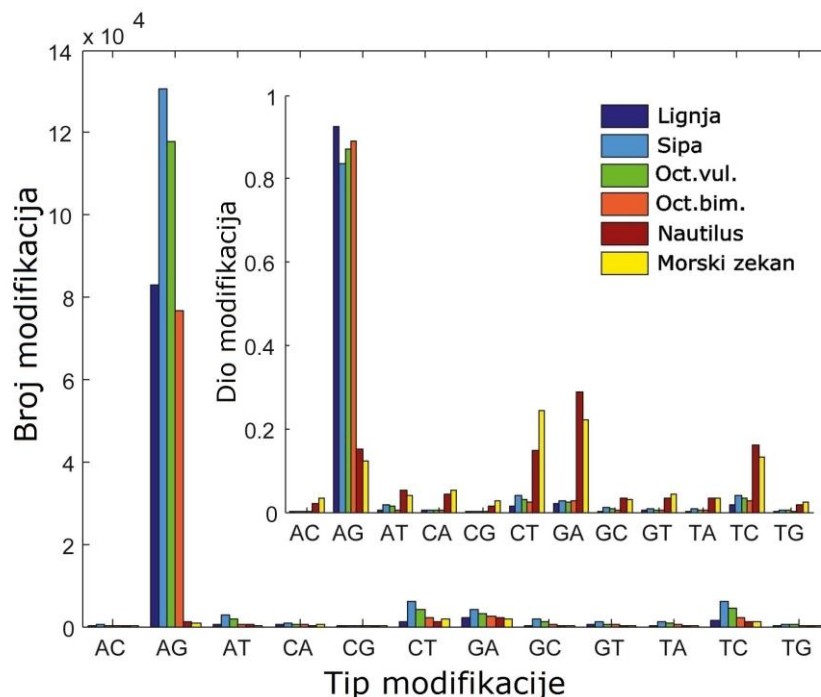


**Slika 5.** Načini kako A→I RNA uređivanje može modificirati mRNA. (UTR od eng. *untranslated region*, netranslatirane regije). (izvor: <https://www.su.se/mbw/research/research-groups/molecular-cell-biology/group-%C3%B6hman/research-projects/rna-editing-in-the-mammalian-brain-1.137591>).

Kod sisavaca, većina uređivanja se događa u ponavljajućim i nekodirajućim dijelovima genoma, posebno *Alu* elementima i intronima (Bazak i sur., 2014). Kod ljudi su pronađeni milijuni mjesta u transkriptomu podložni RNA uređivanju, ali ono je vrlo rijetko u

kodirajućim regijama, dapače smatra se neadaptivnim jer je uočena negativna korelacija između funkcionalne važnosti gena i razine uređivanja (Xu i Zhang, 2014).

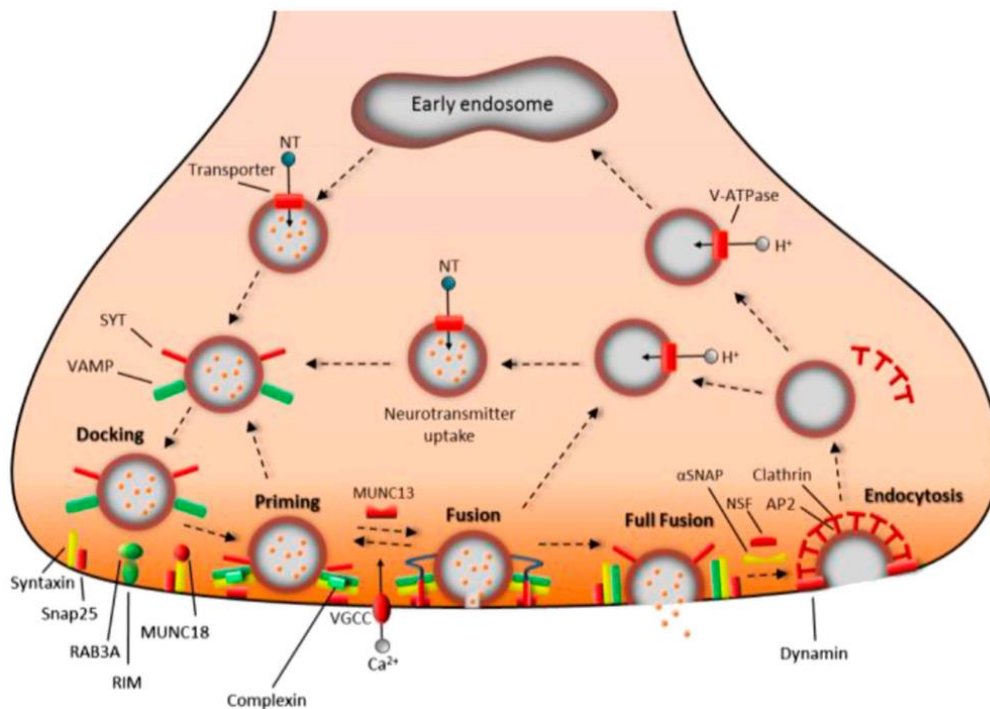
Suprotno tome, Alon i sur. su 2015. godine, korištenjem metoda sekvenciranja druge generacije, pronašli izuzetno visoku razinu RNA uređivanja povezanu s rekodiranjem proteina kod lignje *Doryteuthis pelaeii*, a Liscovitch-Brauer i sur. (2017) su isti nalaz potvrdili i na drugim skupinama glavonožaca. Četiri vrste glavonožaca (dvije vrste hobotnice, *O. bimaculoides* i *O. vulgaris*, lignja *D. pelaeii* i sipa *Sepia officinalis*) su uspoređene s primitivnijim nautiloidom *Nautilus pompilus* i pužem *Aplysia californica* kao vanjskom grupom. Zabilježeno je između 80000-130000 modifikacija sukladnih A→I uređivanju u kodirajućim regijama lignje, hobotnice i sipe, što čini čak 12% svih zabilježenih promjena. Ovo nije slučaj kod *Nautilus* i *Aplysie* (Slika 6). Kod primata, >95% uređivanih mjesta se nalazi u ponavljajućim regijama, dok kod hobotnice *O. bimaculoides* to iznosi tek 21%-38%. Oko trećine proteina *D. pelaelii* ima tri ili više mjesta za rekodiranje i više od 10% ih ima 10 ili više mjesta za rekodiranje (Alon i sur., 2015).



**Slika 6.** Deseci tisuća mjesta A→I uređivanja kod dvije vrste hobotnice (Oct.vul., Oct.bim.), lignje i sipe. Kod morskog zekana i nautilusa navedeno nije uočeno (Liscovitch-Brauer i sur. 2017).



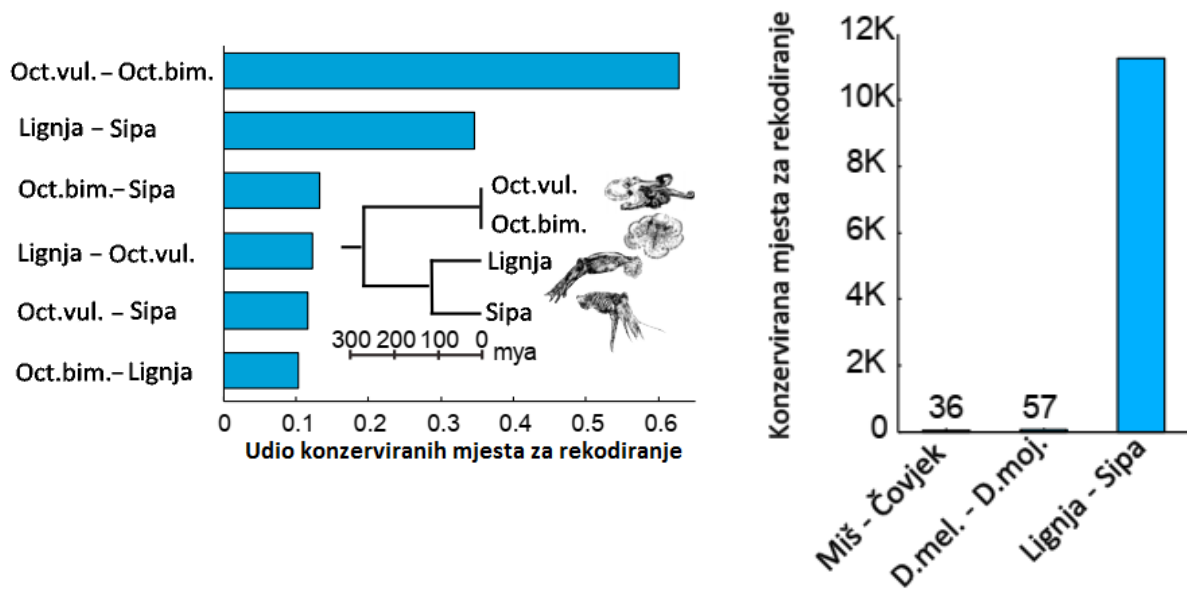
Također, uočeno je da je RNA uređivanje tkivno-specifično: dvostruko više modifikacija je zabilježeno u živčanom nego u ne-živčanom tkivu. Kod Coleoidea čak 11-13% ovih modifikacija rezultira supstitucijama aminokiselina, u odnosu na samo 1% kod sisavaca (Bazak i sur., 2014; Liscovitch-Brauer i sur., 2017). Sukladno tome, rekodiranje je povećano na genima uključenima u metaboličke i signalne puteve povezane s neurološkom funkcijom. Na primjer, od 27 proteina u sinaptičkom ciklusu vezikula, 22 su uređivana od kojih 14 značajnije (Slika 7). Isto tako, od 39 proteina vezanih uz vodljivost aksona, 33 su uređivana od kojih 19 značajnije. Suprotno tome, ribosomalni proteini i RNA polimeraze su uređivani manje od prosjeka što sugerira kako su neki dijelovi zaštićeni od uređivanja (Alon i sur., 2015).



**Slika 7.** Prikaz proteina u transkriptomu lignje uključenih u funkcioniranje sinaptičkih vezikula. Jako uređeni proteini su označeni crvenom bojom, manje intezivno uređeni proteini žutom, a neidentificirani proteini zelenom bojom (Alon i sur., 2015).

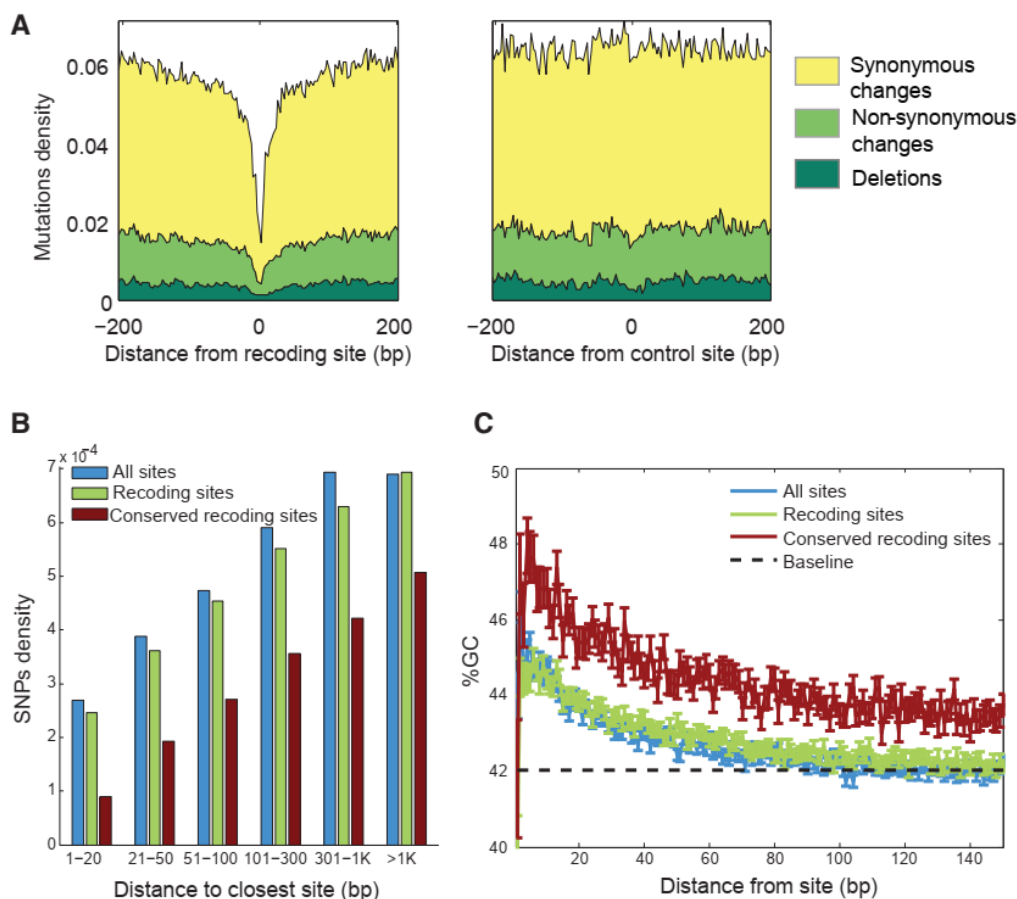
Za razliku od sisavaca, čini se da je RNA uređivanje kod glavonožaca iznimno konzervirano i adaptivno, odnosno evolucijski favorizirano. Pronađeno je ukupno 1146 uređenih mjesta (u preko 443 proteina) zajedničkih za hobotnice, lignje i sipe, s tim da je postotak konzerviranih modifikacija veći između evolucijski bližih vrsta (Slika 8). Broj ne istovjetnih promjena (one koje dovode do promjene aminokiselina) je dvostruko veći od

istovjetnih promjena, a zanimljivo je da se omjer prvih u odnosu na druge povećava s porastom stope uređivanja u proteinima (Alon i sur., 2015; Liscovitch-Brauer i sur., 2017). Nadalje, uređivanje je više zastupljeno u konzerviranim regijama transkriptoma (s više od 95% sličnosti između vrsta) što je znak pozitivne selekcije.



**Slika 8.** RNA uređivanje je kod glavonožaca konzervirano: slika lijevo prikazuje udio dijeljenih mjesta uređivanja između različitih glavonožaca koji je najveći između evolucijski bliskih vrsta. Suprotno tome, vrlo mali broj uređivanih mjesta je konzerviran kod sisavaca i kukaca (rod *Drosophila*) u odnosu na glavonošce (slika desno) (prema Liscovitch-Brauer i sur., 2017).

Međutim, to ima svoju cijenu. Za svoju funkciju ADAR enzimi trebaju specifične dvolančane sekundarne strukture RNA oko mjesta uređivanja, tzv. motive ukosnice, što postavlja određene restrikcije na evoluciju genoma u tim područjima. Doista, uočen je manjak mutacija i polimorfizama jednog nukleotida (SNP), i to 100 nukleotida uzvodno i nizvodno od uređivanih mjesta s povišenim GC sastavom koji je potreban za stabilizaciju sekundarnih struktura (Liscovitch-Brauer i sur., 2017) (Slika 9). Iako intenzivno RNA uređivanje kodirajućih regija omogućava rekodiranje transkriptoma i diversifikaciju proteoma, s druge strane usporava brzinu konvencionalne evolucije na razini DNA.



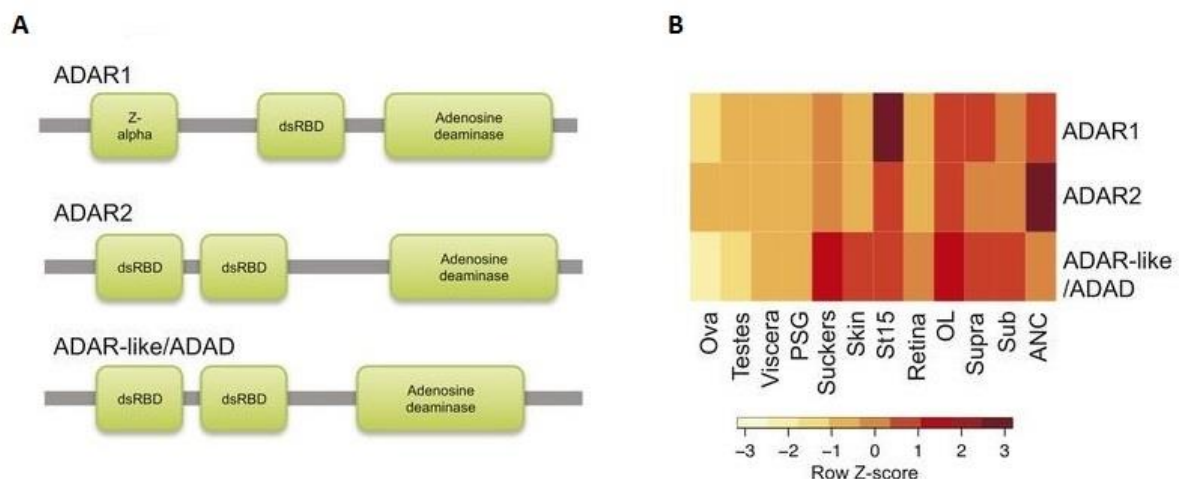
**Slika 9.** A) Broj mutacija između vrsta u regijama koje okružuju konzervirana mjesta rekodiranja (podaci prikazani za lokacije koje dijele lignje i sipe) je značajno smanjen (lijevo). Kao kontrola pokazana je gustoća mutacija oko slučajnih neuređenih adenzina iz istih transkripata (desno). B) Genomski polimorfizmi jednog nukleotida su također manje zastupljeni blizu mjesta za uređivanje kod lignje, posebno konzerviranih mjesta, što potvrđuje smanjenu plastičnost genoma. C) GC-sadržaj je povišen oko mjesta za uređivanje kod lignje, što omogućuje stabilizaciju sekundarnih dvostrukih struktura RNA potrebnih za odvijanje RNA uređivanja. Iscrtkana linija predstavlja pozadinski GC sadržaj preko cijelog okvira čitanja (Liscovitch-Brauer i sur., 2017).

### 2.5.1. Adenoziinske deaminaze specifične za RNA (ADAR)

Svi ADAR-ovi imaju zajedničku arhitekturu domena koja se sastoji od promjenjivog broja malih domena koje specifično vežu dvolančanu RNA, dsRBD-ova (eng. *double-stranded RNA-binding domain*) i C-terminalne domene deaminaze (Slika 10). Domena

deaminaze je velika (300-350 aminokiselina) i katalizira reakciju hidrolitičke deaminacije adenoзина koja mijenja preferencije sparivanja baza (Palavicini i sur., 2009; 2012). Ova reakcija stvara inozin, koji poput gvanozina, ima karbonilni kisik na položaju 6 i stvara bazni par s citozinom. Tijekom prijevoda, inozin se čita kao gvanozin, pa je neto učinak uređivanja A→G promjena.

Postoje dvije katalitički aktivne ADAR obitelji kod kralješnjaka: ADAR1 i ADAR2. Uz ostale strukturne razlike, ADAR1 ima tri dsRBD domene, dok ADAR2 ima samo dvije. Svaki predviđeni ili opisani ADAR2 od žarnjaka do ljudi sadrži samo dvije dsRBD domene, osim jednog. Naime, ADAR2 kod lignje (sqADAR2) sadrži treću dsRBD domenu (Palavicini i sur., 2009). Korištenjem alternativnog prekrajanja ova domena može biti uključena ili isključena, stvarajući ADAR2a i ADAR2b. Dodatni dsRBD lignje ADAR2a povećava njegovu sposobnost za uređivanje specifičnih adenoзина povećavajući afinitet enzima za dsRNA, što dovodi do veće aktivnosti. Ovaj mehanizam omogućava pravilno funkcioniranje enzima u okolišu s visokom koncentracijom soli (Cl<sup>-</sup>) što je specifično za neurone lignje (Palavicini i sur., 2012). Na vezanje utječu i fizički faktori kao što su ionska jakost i sastav, temperatura i pH. Sami ADAR enzimi su također visoko podložni RNA uređivanju što stvara dodatne izoforme i nijanse u njihovoj učinkovitosti (Alon i sur., 2015).

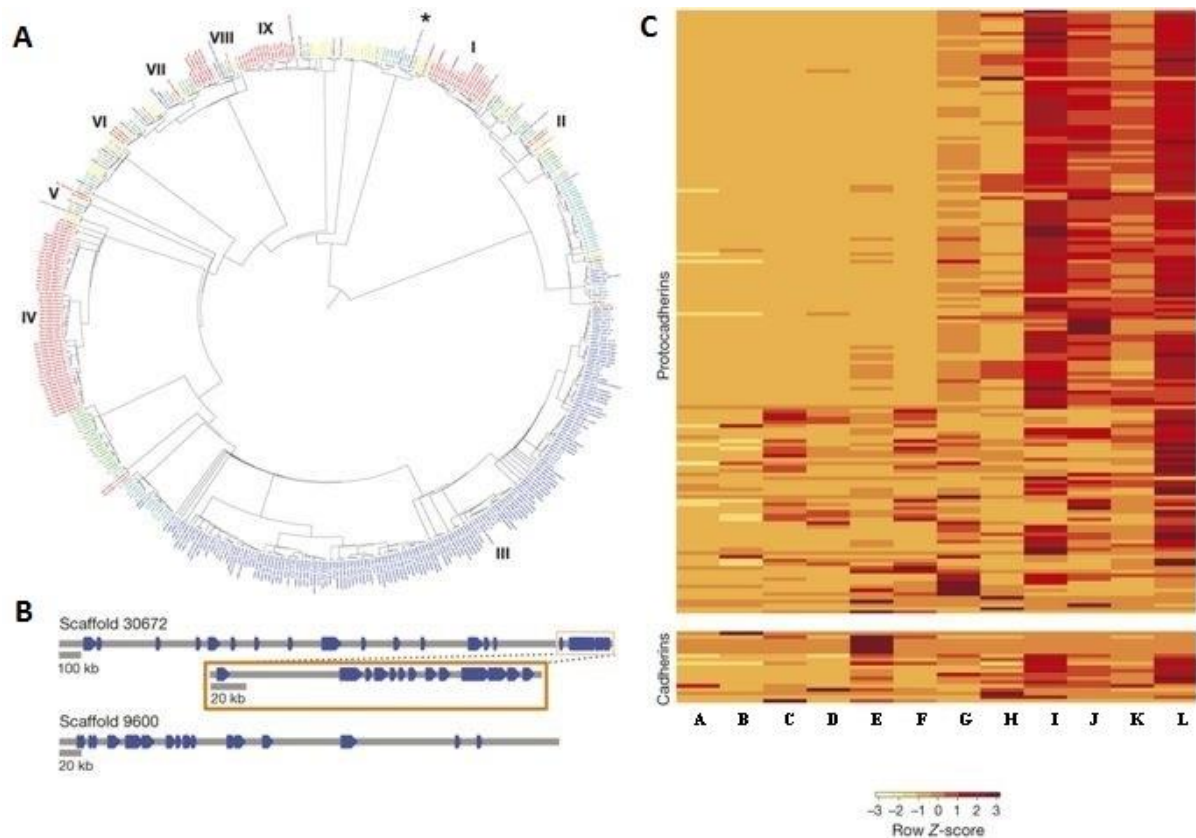


**Slika 10.** A) Kod *Octopus bimaculoides* ADAR1, ADAR2 i ADAR-slični proteini sadrže jednu ili dvije dvolančane RNA vezne domene (dsRBD) kao i domenu adenzin deaminaze. ADAR1 također ima z-alfa domenu. B) Ekspresijski profili triju ADAR gena pronađenih u 12 tkiva *Octopus bimaculoides* korištenjem RNA sekvenciranja (Albertin i sur., 2015).

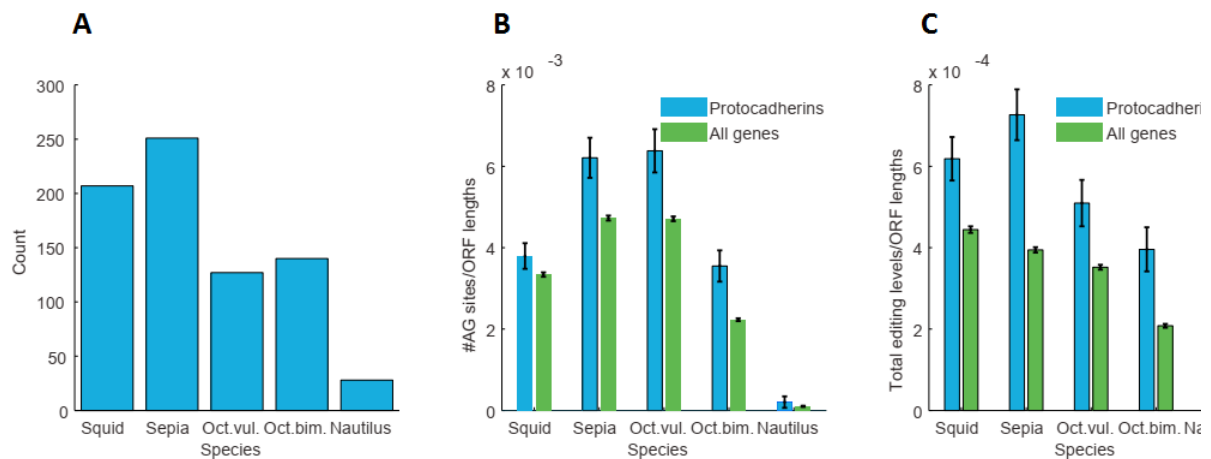
## 2.5.2. Protokaderini

Uloga protokaderina, skupine gena unutar superobitelji kaderina, je kod glavonožaca slična onoj kod kralježnjaka. Imaju važnu ulogu u razvoju i organizaciji živčanog sustava posredujući u stvaranju kompleksne mreže neuronskih veza (Chen i Maniatis, 2013). Primarna uloga im je stanična adhezija, a raznolikost protokaderina omogućava mehanizam za regulaciju interakcija kratkog dometa neuronskih krugova. Protokaderini su zastupljeni kod brojnih vrsta, međutim njihov broj značajno varira (Slika 11A). Morski ježinac *Strongylocentrotus purpuratus* sadrži samo jedan gen, kod vinske mušice *Drosophila melanogaster* i oblića *Caenorhabditis elegans* je došlo do potpunog gubitka ove obitelji, dok su značajno ekspanzirani kod kralježnjaka i glavonožaca, točnije hobotnice *Octopus bimaculoides* (Chen i Maniatis, 2013; Albertin i sur., 2015). Ekspanzija protokaderina kod hobotnice osobito je upečatljiva: identificirano je 168 protokaderina u genomu *O. bimaculoides*, dvostruko više nego kod sisavaca (Albertin i sur., 2015). U genomu su raspoređeni u klustere koji se tandemski ponavljaju (Slika 11B). Mnogi imaju sličnu intron-ezgon strukturu kao i kod kralježnjaka. Budući da su protokaderini *O. bimaculoides* uglavnom izraženi u tkivu živčanog sustava, ova obitelj gena može igrati ulogu u pružanju raznolike molekularne podloge za razvoj naprednog i složenog živčanog sustava (Slika 11C).

Veliki broj protokaderina je pronađen i kod drugih Coleoidea, no ne i kod nautiloidea (Liscovitch-Brauer i sur., 2017). Protokaderini su također podložni intezivnom RNA uređivanju kod Coleoidea, no ne i kod nautilusa (Slika 12). Zanimljivo je da su protokaderini hobotnica i lignji drugačije organizirani; dok se kod hobotnice nalaze u tandemskim klasterima, kod lignje su nepovezani i vjerojatno su se evolucijski razvili neovisno nakon razdvajanja ove dvije taksonomske linije (Albertin i sur., 2015). Ovo bi moglo biti povezano s razlikama u građi živčanog mozga između deseterokračnjaka i osmokračnjaka; razlika se najbolje očituje u vertikalnom režnju, ključnoj strukturi za pamćenje i učenje kod glavonožaca (Albertin i sur., 2015).



**Slika 11.** A) Filogenetsko stablo kaderinskih gena u *Homo sapiens* (crveno), *Drosophila melanogaster* (narančasto), *Nematostella vectensis* (senf žuta), *Amphimedon queenslandica* (žuta), *Capitella teleta*, (zelena), *Lottia gigantea* (tirkizna), *Octopus bimaculoides* (plava) i *Saccoglossus kowalevskii* (ljubičasta). B) Dva najveća klastera protokaderina u nacrtu genoma *Octopus bimaculoides*. C) Ekspresijski profili protokaderina i kaderina kod hobotnice. Protokaderi imaju visoku ekspresiju u živčanim tkivima. (A: jajne stanice, B: testisi, C: utroba, D: stražnja žlijezda slinovnica, E: prijanjalke, F: koža, G: razvojni stadij 15, H: mrežnica, I: optički režanj, J: reznjevi iznad jednjaka, K: reznjevi ispod jednjaka L: aksijalni živac) (Albertin i sur., 2015).



**Slika 12.** **A)** Veliki broj protokaderina pronađen je u sklopljenim transkriptomima za četiri vrste Coleoidea (Squid, Sepia, Oct.vul. i Oct.bim.) (127-251 otvorenih okvira za čitanje), ali ne u Nautilusu (28 otvorenih okvira čitanja). **B i C)** Protokaderini sadrže znatno veći broj AG mjesta (B) i uređuju se na višim razinama (razina uređivanja zbrajaju se na svim mjestima i normaliziraju se duljinom otvorenih okvira čitanja), u sve četiri vrste Coleoidea, ali ne u nautilusu (C) (Liscovitch-Brauer i sur., 2017).

### 2.5.3. Ionski kanali

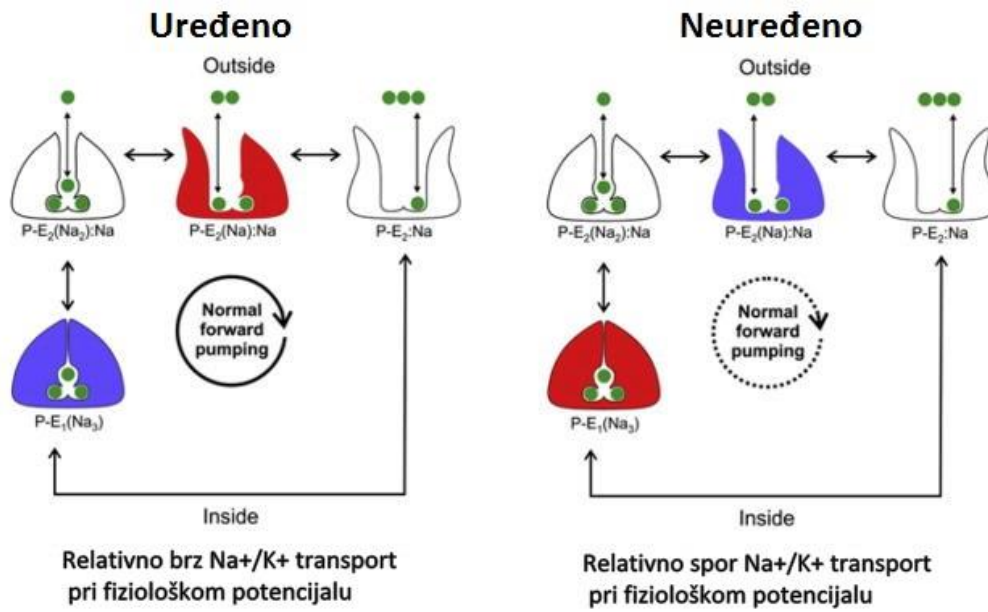
U centralnom živčanom sustavu naponski kalijevi (Kv) kanali igraju važnu ulogu u provođenju živčanih impulsa i kontroli trajanja akcijskog potencijala. Poznati su i kao odgođeni ispravljajući. Kada dođe do pokretanja akcijskog potencijala, Kv kanali se aktiviraju, propuštaju ione kalija i repolariziraju membranski potencijal natrag u stanje mirovanja. Stoga promjene u funkciji Kv kanala mogu imati značajne posljedice na provođenje živčanih impulsa (Holmgren i Rosenthal, 2014). Aktivnost ovih kanala je često modificirana mehanizmom RNA uređivanja.

Kod glavonožaca je uočeno više uređivanih mjesta na mRNA koja kodira Kv kanale nego u čitavom transkriptomu ljudskog mozga (Holmgren i Rosenthal, 2014). Prva mRNA kalijevog kanala člana Kv2 podporodice eksprimiranog u optičkom režnju lignje je analizirana još 1997. godine (Patton i sur., 1997). Ispitana je samo kratka regija mRNA veličine 360 nukleotida i otkriveno je 12 uređivanih mjesta. U idućim studijama istraženi su kalijevi kanali drugih obitelji te je u svima utvrđena značajna razina RNA uređivanja koja utječe na kinetiku zatvaranja iona, kao i napon aktivacije (Holmgren i Rosenthal, 2014).

Predloženo je i da bi ovaj mehanizam mogao biti povezan s temperaturnom aklimatizacijom, kao što su utvrdili Garrett i Rosenthal (2012). Ovi autori su analizirali stopu RNA uređivanja kalijevog ispravljča ortologa SqKv1A.A lignje kod antarktičke hobotnice *Pareledone* sp. i usporedili s onom kod obične hobotnice *Octopus vulgaris*. Genomske sekvence ovih ortologa se nisu mnogo razlikovale, međutim pronađene su razlike u RNA uređivanju. Posebno se istaknula modifikacija I321V (zamjena izoleucina valinom) kod antarktičke hobotnice koja udvostručuje brzinu zatvaranja kanala. Autori su nalaz potvrdili i na drugim polarnim i tropskim vrstama što predstavlja potencijalni mehanizam temperaturne aklimatizacije u živčanom sustavu. Buduće studije će odrediti mogu li organizmi brzo mijenjati opseg RNA uređivanja na specifičnim, funkcionalno relevantnim mjestima kao odgovor na okolišne uvjete ili ta mjesta postepeno nastaju evolucijskom prilagodbom (Holmgren i Rosenthal, 2014).

Lignjin divovski akson poslužio je i kao važan model za razumijevanje funkcije pumpe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaze. Za razliku od naponskih kanala koji provode ione sukladno difuzijskom gradijentu, transporteri ili pumpe to rade mnogo sporije, uz potrošnju energije i suprotno koncentracijskom gradijentu. Stvaranjem gradijenta iona  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  omogućuju pokretačku snagu za akcijske potencijale, sinaptičke potencijale i transport otapala preko plazmatske membrane (Holmgren i Rosenthal, 2014). Kod njih je zabilježena značajno manja razina RNA uređivanja. Međutim, Colina i sur. (2010) su ustanovili da je mRNA podjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaze, aktivne u divovskom aksonu lignje, promijenjena na 4 mjesta što rezultira promjenama u tri aminokiseline. Valin koji se nalazi u sedmom transmembranskom području (I877V) se zamjenjuje izoleucinom, što smanjuje inhibiciju ovisnu o naponu i dolazi do povećanja brzine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpe (Slika 13). Modifikacija I877V je pomaknula ravnotežu prema otpuštanju  $\text{Na}^+$ . Učinkovitost uređivanja na I877V je bila mjesno regulirana između različitih dijelova živčanog sustava, što upućuje na to da RNA uređivanje igra aktivnu ulogu u regulaciji ionske homeostaze, i to vjerojatno kao odgovor na metaboličke zahtjeve različitih neurona (Colina i sur., 2010).





**Slika 13.** Aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpe kod lignje ovisno o prisutnosti RNA uređivanja. Uređene pumpe oslobađaju Na<sup>+</sup> puno brže ( Rosenthal i Seeburg, 2012).

### 3. ZAKLJUČCI

Većina glavonožaca, za razliku od ostalih morskih beskralježnjaka, su jako pokretni, brzi predatori. Takvo ponašanje im omogućuju sofisticirani i djelotvorni osjetni organi i razvijeni živčani sustav. Živčani sustav kao takav formirao se pod kontrolom različitih skupina gena od kojih je ekspanzija i ekspresija protokaderina najvažnija za istaknuti, prvenstveno zbog uloge u regulaciji interakcija kratkog dometa. Nadalje, post-transkripcijska modifikacija RNA molekula ili RNA uređivanje omogućava raznolikost proteoma. Od nekoliko tipova ove modifikacije za glavonošce je karakteristična deaminacija A→I katalizirana enzimskom obitelji adenozijskih deaminaza specifičnih za RNA (ADAR). Ovaj molekularni mehanizam je, za razliku od sisavaca, kod glavonožaca iznimno aktivan u kodirajućim regijama genoma i aktivno sudjeluje u diversifikaciji proteoma, posebno živčanog sustava. Opsežno uređivanje, međutim, smanjuje mogućnost evolucije regija genoma oko mjesta koje se uređuju zbog potrebe za stabilnim sekundarnim dvolančanim RNA strukturama. Iako usporava evoluciju, RNA uređivanje pruža i prednosti. Prije svega, promjene su prolazne, mogu se uključiti ili isključiti, što osigurava fenotipsku fleksibilnost i prilagodljivost na uvjete u okolišu. Osim toga, promjene na razini RNA mogu bolje povećati genetsku raznolikost od promjena na DNA. Moguće je i da primarna svrha RNA uređivanja nije diversifikacija proteoma.

## 4. LITERATURA

- Albertin CB, Simakov O, Mitros T, Wang ZY, Pungor JR, Edsinger-Gonzales E, Brenner S, Ragsdale CW, Rokhsar DS. 2015. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature*, 254: 220-224.
- Bazak L, Haviv A, Barak M, Jacob-Hirsch J, Deng P, Zhang R, Isaacs FJ, Rechavi G, Li JB, Eisenberg E, Levanon EY. 2014. A-to-I RNA editing occurs at over a hundred million genomic sites, located in a majority of human genes. *Genome Research*, 24: 365-376.
- Brusca RC, Brusca GJ. 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Sunderland, USA, 936 str.
- Budelmann BU. 1995. The cephalopod nervous system: What evolution has made of the molluscan design. U: Breidbach O, Kutsch W (ur.), *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, str. 115-135.
- Chen WV, Maniatis T, 2013. Clustered protocadherins. *Development*, 140: 3297-3302.
- Colina C, Palavicini JP, Srikumar D, Holmgren M, Rosenthal JC. 2010. Regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase Transport Velocity by RNA Editing. *PloS Biology*, 8: 1-7.
- Erwin JA, Marchetto MC, Gage FH, 2014. Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 15: 497-506.
- Garrett S, Rosenthal JJ. 2012. RNA editing underlies temperature adaptation in K<sup>+</sup> channels from Polar octopuses. *Science*, 335: 848-851.
- Gray MW. 2012. Evolutionary Origin of RNA Editing. *Biochemistry*, 5242: 5235-5236.
- Hochner B, Shomrat T, Fiorito G. 2006. The octopus: a model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. *The Biological Bulletin*, 210: 308-315.
- Holmgren M, Rosenthal JJC. 2014. Regulation of Ion Channel and Transporter Function Through RNA Editing. *Current Issues in Molecular Biology*, 7: 23-36.
- Liscovitch-Brauer N, Alon S, Porath HT, Elstein B, Unger R, Ziv T, Admon A, Levanon EY, Rosenthal JJC, Eisenberg E. 2017. Trade-off between Transcriptome Plasticity and Genome Evolution in Cephalopods. *Cell*, 169: 191-202.
- Liu, H, Chang LH, Sun Y, Lu X, Stubbs L. 2014. Deep vertebrate roots for mammalian zinc finger transcription factor subfamilies. *Genome Biology and Evolution*, 6: 510-525.

- MolluscaBase. 2018. Cephalopoda. Dostupno sa: <http://www.molluscabase.org/aphia.php?p=taxdetails&id=11707>, pristupljeno: kolovoz, 2018.
- Nishikura K. 2010. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 321-349.
- Palavicini JP, O'Connell MA, Rosenthal JJC. 2009. An extra double-stranded RNA binding domain confers high activity to a squid RNA editing enzyme. *RNA*, 15: 1208-1218.
- Palavicini JP, Correa-Rojas RA, Rosenthal JJC. 2012. Extra Double-stranded RNA Binding Domain (dsRBD) in a Squid RNA Editing Enzyme Confers Resistance to High Salt Environment. *The Journal of Biological Chemistry*, 287: 1-6.
- Patton DE, Silva T, Bezanilla F. 1997. RNA editing generates a diverse array of transcripts encoding squid  $K^{+2} K^{+}$  channels with altered functional properties. *Neuron*, 19: 711-722.
- Rosenthal JJ, Seeburg PH. 2012. A-to-I RNA editing: effects on proteins key to neural excitability. *Neuron*, 74: 432-439.
- Young JZ. 1971. *Anatomy of the Nervous System of Octopus vulgaris*. Clarendon Press, Oxford, 690 str.
- Xu G, Zhang J. 2014. Human coding RNA editing is generally nonadaptive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111: 3769-3774.
- Alon S, Garrett SC, Levanon EY, Olson S, Graveley BR, Rosenthal JJ, Eisenberg E. 2015. The majority of transcripts in the squid nervous system are extensively recoded by A-to-I RNA editing. *eLIFE*, 4: 1-14.